

**Hazánkban nagy mennyiségben fogyasztott
gyógyszerek maradványainak követése felszíni
vizeinkben: gyomorsav-túltengést csökkentő, illetve
szívgyógyszerek kimutatása SPE-LC-MS/MS
módszerrel**

Varga Renáta



ELTE Kémiai Doktori Iskola

Vezető: Dr. Inzelt György

Analitikai, Kolloid- és Környezetkémia, Elektrokémia Program

Vezető: Dr. Záray Gyula

Témavezető: Dr. habil. Torkos Kornél egy. docens

ELTE Kémiai Intézet

Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratórium

2012.

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Köszönetnyilvánítás	4
3. Rövidítésjegyzék	5
4. Bevezetés	7
5. Irodalmi áttekintés	8
5.1 Betegségek alakulása Magyarországon	8
5.2 Gyógyszerfogyasztás Magyarországon	13
5.3 Szennyvíz és szennyvíztisztítás	15
5.4 Gyógyszermolekulák megjelenése a felszíni vizekben	18
5.5 Elválasztástechnikai módszerek a vízanalitikában	21
5.5.1 Minta-előkészítés	21
5.5.2 Analitikai módszer	25
5.5.3 A tömegspektrométer mint detektor	30
5.6 Gyógyszerhatóanyag maradványok kimutatásának módszerei	42
5.7 A vizsgálatra kiválasztott komponensek	48
5.8 A vizsgált komponensek ismert metabolitjai	53
5.9 Ismeretlen metabolitok azonosítására alkalmas eljárások	57
6. Célkitűzés	58
7. Kísérleti rész	59
7.1 Felhasznált anyagok	59
7.2 Törzs- és kalibráló oldatok készítése	59
7.3 A vizsgált molekulák tömegspektrometriás paramétereinek meghatározása	60
7.4 Az LC-MS módszer kidolgozása, az analízis körülményei	63
7.5 A szilárd-fázisú extrakciós minta-előkészítési módszer kidolgozása	67
7.5.1 Különböző SPE patronok tesztelése	67
7.5.2 Mátrix-hatás vizsgálat	69
7.6 A módszer validálása	73
7.6.1 Specifitás / Szelektivitás	73
7.6.2 Linearitás	74

7.6.3	Precizitás	75
7.6.4	Torzítatlanság	75
7.6.5	Kimutatási határ.....	76
7.6.6	A mennyiségi meghatározás határa	76
7.6.7	Stabilitás.....	76
7.7	A kidolgozott módszer alkalmazása Dunavíz mintákra.....	79
7.8	Gyógyszermetabolitok kimutatása felszíni vízből.....	81
7.8.1	A prediktív MRM módszer felépítése és tesztelése.....	81
7.8.2	A kimutatott metabolitok igazolása LC-TOF-MS-sel	92
7.9	Környezetterhelés-vizsgálat	94
8.	Összefoglalás	113
9.	Summary	114
10.	Függelék	115
10.1	A vizsgált komponensek szerkezeti képlete és hivatalos elnevezése	115
10.2	A szilika alapú SPE patronokon alkalmazott minta-előkészítési eljárások	121
10.3	A polimer alapú patronokon alkalmazott minta-előkészítési eljárások	122
10.4	Az extrahált ionkromatogramokhoz felhasznált pontos tömeg értékek.....	123
11.	Irodalomjegyzék.....	126

2. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Torkos Kornélnak, témavezetőmnek, és Dr. Eke Zsuzsannának, az Elválasztástechnikai Kutató- és Oktató Laboratórium vezetőjének, hasznos tanácsaikat, észrevételeiket és segítségüket doktori kutatásaim során.

Köszönöm az ELTE Kémiai Intézetének, a Vegyész Oktatásért Alapítványnak, a Wessling Nonprofit Kft.-nek és a Kromat Kft.-nek, hogy lehetőséget és támogatást nyújtottak doktori tanulmányaim elvégzéséhez.

Köszönöm Dr. Szabó Pálnak, hogy előadásai során rámutatott az analitika szépségeire és kihívásaira, így neki köszönhetően érdeklődésem is ebbe az irányba terelődött. Továbbá köszönöm neki, hogy segített elindulnom ezen a területen.

Köszönöm a rengeteg támogatást és kitartást szüleimnek, húgomnak és páromnak.

Végül, de nem utolsósorban, köszönöm az EKOL mindenkori hallgatóinak segítségét, támogatását és a kellemes légkör megalapozását.

3. Rövidítésjegyzék

ACE: Angiotenzin konvertáló enzim (Angiotensin Converting Enzyme)
ACN: Acetonitril
APCI: Atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció
(Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI: Atmoszférikus nyomású fotoionizáció
(Atmospheric Pressure Photoionization)
ATC-index: A gyógyszerek anatómiai, terápiás, illetve kémiai osztályozása
BSTFA: *N,O*-bis(trimetilszilil)trifluoroacetamid
CE: Kapilláris elektroforézis (Capillary Electrophoresis)
CE (V): Ütközési energia a fragmensek képződéséhez (Collision Energy)
CI: Kémiai ionizáció (Chemical Ionization)
DAD: Diódasoros detektor (Diode Array Detector)
DHP: Dihidropiridin
EI: Elektron ionizáció (Electron Ionization /Electron Impact)
EIC: Extrahált ionkromatogram (Extracted Ion Chromatogram)
ECD: Elektronbefogásos detektor (Electron Capture Detector)
ELSD: Fényszórás elvén működő detektor (Evaporative Light Scattering Detector)
EPH: Extrahálható ásványolaj eredetű szénhidrogén (Extractable Petrol Hydrocarbon)
ESI: Electrospray ionizáció (Electrospray Ionization)
EU: Európai Unió
FID: Lángionizációs detektor (Flame Ionization Detector)
FLD: Fluoreszcens detektor (Fluorescence Detector)
FT-ICR: Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia analízátor
(Fourier-transform ion cyclotron resonance)
GC: Gázkromatográfia (Gas Chromatography)
GC-MS: Gázkromatográfia tömegspektrometria kapcsolt technika
(Gas Chromatography – Mass Spectrometry)
HIC: Hidrofób kölcsönhatású kromatográfia (Hydrophobic Interaction Chromatography)
HILIC: Hidrofil kölcsönhatású kromatográfia (Hydrophilic Interaction Chromatography)
HLB: hidrofíli-lipofíli balance SPE patron (Oasis HLB, Waters)
HMG CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A
IDA: Információ függő analízis (Information Dependent Analysis)
IEX: Ioncserélő kromatográfia (Ion Exchange Chromatography)
IPA: izopropil-alkohol (2-propanol)
IT: Ioncsapda analízátor (Iontrap)
LC: Folyadékkromatográfia (Liquid Chromatography)
LC-MS: Folyadékkromatográfia tömegspektrometria kapcsolt technika
(Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)

LDL: Alacsony sűrűségű lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
 LIT: Lineáris ioncsapda (Linear Iontrap)
 LLE: Folyadék-folyadék extrakció (Liquid-Liquid Extraction)
 LOD: Kimutatósi/Detektálási határ (Limit of Detection)
 LOQ: Mennyiségi meghatározási határ (Limit of Quantitation)
 MCP: Mikrocsatornás lemez detektor (Microchannel plate detector)
 MeOH: Metanol
 MEPS: Szilárd-fázisú töltetes mikroextrakció (Micro Extraction by Packed Sorbent)
 MIP: Molekuláris lenyomatú polimer (Molecularly Imprinted Polymer)
 MRM: Több reakciókövetési mód (Multiple Reaction Monitoring)
 MS: Tömegspektrometria (Mass Spectrometry)
 MSTFA: *N*-metil-*N*-(trimetilszilil)trifluoroacetamid
 MTBSTFA: *N*-(terc-butildimetilszilil)-*N*-metiltrifluoroacetamid
 NPLC: Normál fázisú folyadékkromatográfia (Normal Phase Liquid Chromatography)
 OEP: Országos Egészségügyi Pénztár
 PAH: Poliaromás szénhidrogének (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon)
 PESM: Poszt-extrakciós adalékolás módszere (post-extraction spike method)
 PTFE: poli-tetrafluor-etilén
 Q: Kvadrupól analízátor
 QqQ: Hármass kvadrupól analízátor (Triple quadrupole)
 QTRAP: Kvadrupól ioncsapdás készülék
 RID: Törésmutató detektor (Refractive Index Detector)
 RPLC: Fordított fázisú folyadékkromatográfia (Reversed Phase Liquid Chromatography)
 SEC-GPC: Méretkizárásos – gélpermeációs kromatográfia
 (Size Exclusion Chromatography – Gel Permeation Chromatography)
 SIM: Kiválasztott ionfolyamat követés (Selected Ion Monitoring)
 SPE: Szilárd-fázisú extrakció (Solid Phase Extraction)
 SPME: Szilárd-fázisú mikroextrakció (Solid Phase MicroExtraction)
 SRM: Szelektív reakciókövetési mód (Selected Reaction Monitoring)
 STM: 2 µm alatti szemcseméretű folyadékkromatográfiai oszlop (sub-2 µm)
 TB: Társadalom Biztosítás
 TIC: Totál ionkromatogram (Total Ion Chromatogram)
 TOF: Repülési idő analízátor (Time-of-flight)
 UHPLC: Ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
 (Ultra high pressure liquid chromatography)
 UV-VIS: Ultraibolya-látható detektor (Ultra-Violet – Visible detector)
 ZDV: Összekötő elem, kromatográfiai oszlop nélküli mintabevitelhez (Zero Dead Volume)

4. Bevezetés

Köszönhetően az öregedő társadalomnak, az ipar növekvő környezetszennyezésének és a tartósítószerekkel, színezékekkel adalékolt, feldolgozott élelmiszereknek manapság egyre több ember küzd különböző komolyabb betegségekkel. A fent említettek, illetve a gyógyszergyárak fejlődésének hatására napjainkban a különböző vényköteles, illetve vény nélkül beszerezhető gyógyszerek - bár ez utóbbiak felhasználása nehezen követhető - fogyasztása egyre jobban elterjedt, mind Európában, mind pedig Magyarországon.

A nem megfelelő hulladékkezelés következtében közvetlenül, illetve a szennyvíztisztító eljárások kis hatékonysága miatt közvetetten is, felszíni vizeinkbe kerülhetnek a megvásárolt gyógyszerek és azok esetlegesen aktív metabolitjai is. Bár ez a szennyezés az emberek szervezetére közvetlenül nem káros, viszont a vízi élővilág fejlődését és fennmaradását jelentősen befolyásolja. Ugyanakkor egyes gyógyszerek a halak szöveteiben feldúsulhatnak, ami így már az emberekre nézve is veszélyes lehet.

Éppen ezért felszíni vizeink gyógyszer-maradvány tartalmának monitorozása egy igen fontos környezetvédelmi feladat, amely az utóbbi időben egyre nagyobb érdeklődésre tett szert. Ezen módszerek kidolgozásakor fontos szempont a különböző gyógyszerek felhasználásának gyakorisága, azok kiürülése az emberi szervezetből, illetve hatásuk a különböző vízi élőlényekre.

Az utóbbi időben egyes gyógyszercsoportok kitüntetett figyelmet kaptak az analitikai kutatók körében, melyekre egyre több és egyre hatékonyabb mérési módszereket dolgoztak ki. Ilyenek például a hormonok, az antibiotikumok és a nem szteroid alapú gyulladáscsökkentők. A korábban kidolgozott módszerek nagy része gázkromatográfiás tömegspektrometriás (GC-MS) eljárású volt, mára azonban előtérbe kerültek a folyadékkromatográfiás tömegspektrometriás (LC-MS) módszerek.

Jelen dolgozat a fenti környezetvédelmi mérések kiterjesztésére törekszik. Olyan gyógyszercsoportok vizsgálata kap szerepet, melyek fogyasztása hazánkban igen elterjedt, ezért jelentős terhelést jelenthetnek felszíni vizeink élővilágára nézve.

5. Irodalmi áttekintés

5.1 Betegségek alakulása Magyarországon

Statisztikai adatok szerint a magyar felnőttek több mint 40 %-a szívpanaszokkal fordult a háziorvosához 2007-ben. További 19 % endokrin rendszeri, míg 15 % mozgás szervrendszeri rendellenességgel [1]. E vezető betegségek gyakorisága 1999-ig visszamenőleg is számottevő, illetve a betegek száma folyamatosan növekedett a statisztikában feltüntetett nyolc év alatt. További nagybetegszámú csoportok a légúti megbetegedések, az asztma, illetve a fekélyek, bél- és májgyulladások. Az alábbi táblázatban foglaltam össze a 2007-ben háziorvoshoz fordult felnőttek számát a különböző betegség csoportok szerint:

Betegség csoport	Felnőtt betegek száma (fő / 2007)	Az összes beteg %-a
Szívbetegségek	4 125 530	42,62
Endokrin rendszer rendellenességei	1 815 621	18,76
Mozgás szervrendszeri rendellenességek	1 404 139	14,50
Légúti megbetegedések, asztma	536 658	5,54
Fekélyek, bél- és májgyulladások	503 131	5,20
Vérképzőszervek, immunrendszer betegségei	360 438	3,72
Agyi eredetű problémák	307 217	3,17
Rosszindulatú daganatok	235 621	2,43
Pszichológiai rendellenességek	178 519	1,84
Érzékelésvesztés	110 575	1,14
Veseműködés rendellenességei	70 040	0,72
Gümőkór és következményei	18 699	0,19
Vírusos májgyulladás	14 445	0,15

1. táblázat – Felnőtt betegek számának alakulása 2007-ben [1]

Az egyes betegség csoportokon belül további kategorizálást is elvégezve még pontosabb képet kaphatunk arról, hogy melyek a leggyakrabban előforduló betegségek hazánkban. Tekintve a fenti rangsor szerinti öt leggyakoribb betegség csoportot a szívbetegségek további öt alcsoportra bonthatók, melyen belül a magas vérnyomás tölti be a vezető szerepet:

Betegség típusa	Felnőtt betegek száma (fő / 2007)	Az összes beteg %-a
Magas vérnyomás	2 531 689	61,37
Isémiás szívbetegségek	999 550	24,23
Cerebrovaszkuláris betegségek	436 357	10,58
Egyéb formák	126 126	3,06
Idült reumás szívbetegségek	31 808	0,77

2. táblázat – Szívbetegségek típusai és azok betegeinek száma 2007-ben [1]

Az endokrin rendszer rendellenességei is további öt alcsoportra bonthatók, melyen belül a lipoprotein anyagcsere rendellenességei és egyéb lipidémiák a leggyakoribbak:

Betegség típusa	Felnőtt betegek száma (fő / 2007)	Az összes beteg %-a
Lipoprotein anyagcsere rendellenességei és egyéb lipidémiák	842 412	46,40
Diabetes mellitus	692 927	38,16
Pajzsmirigy rendellenességei	250 300	13,79
Egyéb endokrin rendellenességek	28 007	1,54
Cisztás fibrózis	1 975	0,11

3. táblázat – Endokrin betegségek típusai és azok betegeinek száma 2007-ben [1]

A mozgás szervrendszeri rendellenességek hat további alcsoportra bonthatók, melyek közül a leggyakoribb a gerinc egyik speciális deformálódása, az ún. spondylopathia:

Betegség típusa	Felnőtt betegek száma (fő / 2007)	Az összes beteg %-a
Spondylopathiák	683 557	48,68
Oszteoporózis	364 583	25,96
Deformáló hátgerinc elváltozások	157 789	11,24
Köszvény	143 951	10,25
Szeropozitív és egyéb rheumatoid arthritis	49 873	3,55
Fiatalkori ízületi gyulladás	4 386	0,31

4. táblázat – Mozgás szervrendszeri betegségek típusai és azok betegeinek száma 2007-ben
[1]

A negyedik leggyakoribb betegség csoport az idült alsó légúti betegségek és az asztma, melyek közül az előbbibe a légúti panaszokkal rendelkezők 60 %-a, míg az utóbbiba azok 40 %-a tartozik:

Betegség típusa	Felnőtt betegek száma (fő / 2007)	Az összes beteg %-a
Idült légúti betegségek	325 192	60,60
Asztma	211 466	39,40

5. táblázat – Légúti megbetegedések típusai és azok betegeinek száma 2007-ben [1]

Végül pedig a statisztikai adatok szerint az emésztőszervrendszeri megbetegedések közül a különböző fekélyek okozták a legnagyobb problémát a felnőtt lakosság körében:

Betegség típusa	Felnőtt betegek száma (fő / 2007)	Az összes beteg %-a
Gyomor-, nyombél-, gastrojejunális fekély	262 083	52,09
A máj betegségei	166 964	33,18
Nem fertőzőesés vékony- és vastagbélgyulladás	74 084	14,72

6. táblázat – Emésztőszervrendszeri betegségek típusai és azok betegeinek száma 2007-ben
[1]

A fentiekkel ellentétben a 18 év alatti lakosság körében teljesen másképp alakult a különböző betegség csoportok gyakorisága, továbbá az is megfigyelhető, hogy a regisztrált gyermekkorú betegek száma jóval csekélyebb, mint a felnőtteké, összesen 711 192 fő [2]. Ezen belül is az egyes csoportok betegeinek száma csak igen kevés esetben éri el a 10 000 főt egy év alatt, azaz jóval kisebb százalékban járulnak hozzá az egyes betegség csoportok összes betegeinek számához.

Az alábbi táblázatban csak azokat a gyermekbetegségeket soroltam fel, amelyek meghaladták a 10 000 beteg/év létszámot:

Betegség csoport	Gyermek betegek száma (fő / 2007)	Az összes beteg %-a
Endokrin, táplálkozási és anyagszere betegségek	82 811	11,64
Asztma	79 776	11,22
Vérképzőszervek, immunrendszer betegségei	77 466	10,89
Atópiás dermatitisz	73 125	10,28
Vashiányos anémia	59 245	8,33
Szemizmok, szemmozgatóbetegségei	55 327	7,78
Deformáló hátgerinc elváltozások	52 232	7,34
Kalóriatöbblet miatti elhízás	50 094	7,04
Mentális- és viselkedészavarok	39 976	5,62
Pszichés fejlődés rendellenességei, magatartási, emocionális zavarok	15 794	2,22
Keringési rendszer veleszületett rendellenességei	13 865	1,95
Mentális retardáció	12 334	1,73
Epilepszia	11 401	1,60
Magas vérnyomás	10 643	1,50

7. táblázat – Leggyakoribb gyermekbetegségek és azok betegeinek száma 2007-ben [2]

5.2 Gyógyszerfogyasztás Magyarországon

A világra jellemző tendenciát követve hazánkban is évről évre nő a gyógyszerfogyasztás, melynek alappillére a népesség életkorának folyamatos növekedése. Ezt kiegészíti - a globalizációnak köszönhetően - a drága, innovatív külföldi orvosságok megjelenése a hazai piacon, illetve az itthoni gyógyszergyárak fejlődése is. Mindezek ellenére a magyarországi gyógyszerfogyasztás még így sem éri el a fejlettebb, ám sok tekintetben egészségesebb lakosságú EU-országok fogyasztását [3].

Felmérések szerint a háztartások jelentős összegeket költenek egészségügyi kiadásokra, azon belül is a vényköteles, illetve a vény nélkül beszerezhető gyógyszerek megvásárlására. Az alábbi táblázatban foglaltam össze az egészségügyi kiadások megoszlását a magyarországi háztartásokban 2007-ben és 2008-ban:

Egészségügyi kiadás típusa	Háztartások %-a	
	2007	2008
Vényköteles gyógyszerek	82	97
Vény nélkül kiadható gyógyszerek	68	60
Vitaminok, táplálékkiegészítők	57	50
Egyéb gyógyhatású készítmények	46	36
Magánorvosi rendelés, paraszolvencia	25	30
Alternatív gyógyászat (Természetgyógyász, homeopátia)	10	11

8. táblázat – Egészségügyi kiadások megoszlása a magyarországi háztartásokban 2007-ben és 2008-ban [4]

A fenti táblázatból is jól látható, hogy a vényköteles gyógyszerek fogyasztása nemcsak, hogy nagymértékű, de még növekvő tendenciát is mutat, annak ellenére, hogy a vizsgálatok szerint az átlagnál jelentősen nagyobb ezen gyógyszerek fogyasztása az idős, jellemzően alacsonyabb jövedelmű nyugdíjasok, valamint a krónikus betegek körében. Ezzel szemben a vény nélkül kapható készítmények, vitaminok és táplálékkiegészítők legfőbb vásárlóerejét a fiatalabb, 18-36 év közötti korosztály jelenti. Alternatív

gyógyászatra inkább az 50 év alattiak áldoznak, míg magánorvosi rendelésekre főként a 36-45 év közötti, magasabb jövedelemmel rendelkező lakosok költenek.

Továbbá az OEP nyilvántartásaiból az is kiderül, hogy a gyógyszerekre kifizetett TB támogatások több mint egy harmada szív- és érrendszeri betegségek kezelésére szolgáló gyógyszereket támogatott [4], amely egybevág a magyarországi vezető betegség csoport adatokkal (ld. 1. táblázat) és a 2006-ban legnagyobb forgalmú gyógyszerek rangsorával is [5]:

Készítmény	Hatóanyag	ATC-kód	Gyógyszergyártó
Plavix	klopidrogél	B	Sanofi-Aventis
Coverex	perindopril	C	Egis
Glivec	imatinib	L	Novartis
Neorecormon	B-epoetin	B	Roche
Sortis	atorvasztatin	C	Pfizer
Controloc	pantoprazol	A	Altana Pharma
Normodipine	amlodipin	C	Richter Gedeon
Nexium	ezomeprazol	A	AstraZeneca
Tritace	ramipril	C	Sanofi-Aventis
Quamatel	famotidin	A	Richter Gedeon

9. táblázat – Legnagyobb forgalmú gyógyszerek Magyarországon (2006) [5]

A fenti táblázatban a 2006-ban legnagyobb mennyiségben eladott első tíz készítményt soroltam fel, illetve azok hatóanyagát és az ún. ATC-kódjukat. Ez utóbbi alapján könnyedén eldönthető, hogy mely gyógyszerek milyen betegségek kezelésére alkalmasak, illetve látható az egyazon betegség csoportok kezelésére vásárolt gyógyszerek gyakorisága. Megfigyelhető, hogy a tíz készítmény közül legtöbb a C jelzésű csoportba tartozik, amelyek a kardiovaszkuláris rendszer gyógyszerei, majd ezt követik az A csoport készítményei, amelyek a tápcsatorna és anyagcsere rendellenességeire valók, majd a B csoport, amelyek a vér és vérképzőszervek gyógyszerei és végül az L csoport egyetlen tagja a daganatellenes szerek és immunmodulátorok közé tartozik.

5.3 Szennyvíz és szennyvíztisztítás

A víz antropogén felhasználása során szennyvízzé válik, melynek következtében a víz emberi használatra részben, vagy teljesen alkalmatlan lesz, illetve a természetes vízi életfolyamatok kárt szenvednek.

A szennyvizekben található legfontosabb szennyezőanyagok:

- Úszó és lebegő szennyeződések, melyek nagyobb része mechanikai tisztítással eltávolítható.
- Biológiailag bontható szerves szennyezőanyagok.
- Növényi tápanyagok (magas nitrogén- és foszfor tartalommal).
- Toxikus nehézfémek és szerves mikroszennyezők.
- Szerves mikroszennyezők: növényvédőszer, kőolajok és származékai, szintetikus mosószerek, huminanyagok, poliklórozott bifenilek, fenolok, dioxinok és a különböző gyógyszermolekulák.

A szennyvíz, keletkezése és a szennyezőanyag-tartalma szerint, két nagy csoportra osztható: kommunális szennyvíz, illetve ipari és mezőgazdasági szennyvíz.

A kommunális szennyvíz – amelyben felmosó víz, mosóvíz, fürdővíz, ételmaradék, széklet, vizelet, stb. található - egyik jellemzője a nagy szervesanyag-tartalom, melynek veszélye, hogy ennek bomlása során lecsökken a víz oldott oxigén tartalma, ami a vízi élővilág csökkenéséhez, illetve kihalásához vezethet. A települési szennyvizek másik jellemzője a nagy tömegű mikroorganizmus, ami közvetlen fertőzésveszélyt jelent a környezet számára.

Ezzel szemben az ipari és mezőgazdasági szennyvíz összetétele üzemként változhat, melynek köszönhetően ezek hatásai, veszélyei is különböznek. Magas szervesanyag-tartalommal bírnak például a vágóhidak, húszemek, konzervgyárak vagy szappangyárakban keletkező szennyvizek, míg a bőrníró telepek, az állati tetemek feldolgozásával foglalkozó üzemek, illetve a cserzőüzemek szennyvize fertőző jellegű. Ugyanakkor a tejüzemek, gyapjúmosók, fémmegmunkáló telepek nagymennyiségű olajokat és zsírokat tartalmazó szennyvizet termelnek, a festőüzemek vagy a galvanizáló üzemek szennyvize mérgező anyagokat tartalmaz, míg a laboratóriumok, kórházak vagy atomerőművek pedig akár radioaktív anyagokat. Éppen ezért a speciális szennyvizek tisztítása egyedi módszereket igényel [6].

A szennyvíztisztítás feladata - melynek módja nagymértékben függ a szennyvíz jellegétől - a szennyező anyagok olyan mértékű eltávolítása, hogy a vízben maradó szennyezéseket a befogadó természetes víz öntisztító ereje képes legyen lebontani.

A kommunális szennyvizek hagyományos, ún. mesterséges tisztításának három fokozata lehetséges [7]:

1. *Elsőfokú, vagy mechanikai tisztításkor* a szennyvíz fizikailag elválasztható, darabosabb úszó és lebegő anyagait, rácsok, szűrők, üleptető berendezések segítségével, illetve homokfogók alkalmazásával a csatornahálózaton elvezetett szennyvízbe bekerülő homokot távolítják el.

2. *Másodfokú, vagy biológiai tisztítás* folyamán elszaporítják a szennyvízben lévő mikroorganizmusokat, melyek - oxigén jelenlétében - élő sejtanyaggá és szén-dioxiddá alakítják a szennyvíz szerves anyagait, ezáltal csökkentik a víz szennyező hatását. A biológiai tisztítás két legelterjedtebb technológiája az ún. csepegtetőtestes, illetve az eleveniszapos tisztítás.

Csepegtetőtestes tisztításkor az előüleptített szennyvíz a nagy fajlagos felületű töltőanyagra települt biológiai hártya mikroorganizmusainak lebontó képessége folytán tisztul meg. Ilyenkor a szükséges oxigént a természetes légmozgás biztosítja.

Az országsszerte leggyakrabban alkalmazott eleveniszapos tisztítás szuszpendált állapotban lévő baktériumokat használ az oldott és kolloid állapotú szerves anyagoknak szén-dioxiddá és vízzé való oxidálásához. Az eljárás során a mechanikailag előtisztított szennyvíz nagy mikroorganizmus tömeget tartalmazó ún. eleveniszapos medencébe kerül. Itt a mikroorganizmusok életben tartása és nagy számban történő megújítása érdekében az iszap – szennyvíz keveréket levegőztetik, keverik és áramoltatják. Bizonyos idő elteltével az eleveniszapot üleptítéssel elválasztják a víz fázistól, és egy részét fölös iszapként elvezetik, másik részét visszaforgatják az újonnan érkező szennyvíz „beoltása” céljából.

3. A *harmadfokú tisztítás* során a biológiai fokozat végtermékeként keletkezett szervesetlen anyagokat – például nitrátok, foszfátok – távolítják el. Ezt a tisztítási fokozatot elsősorban ott alkalmazzák, ahol a befogadó élővíz érzékeny pl.: állóvizek, kis vízhozamú vízfolyások, azonban a technológia bonyolult és drága, ezért széles körben még nem terjedt el.

Végso lépésként a szennyvizet fertőtlenítik, melynek célja az előforduló kórokozó mikroorganizmusok elpusztítása, illetve a fertőzőképesség megszüntetése. A jelenleg alkalmazott technológiák elsősorban klórt, klór-dioxidot, ozont és nátrium-hipokloritot alkalmaznak, de ismeretes még az ezüst, a jód és a bróm felhasználása is.

A tisztított szennyvíz befogadója lehet felszíni víz vagy talaj (mezőgazdasági területek, faültetvények). Hazánkban a tisztított szennyvizet általában felszíni vízfolyásokban helyezik el. A mesterséges tisztítás kiküszöbölhetetlen mellékterméke a szennyvíziszap, melynek legnagyobb részét az utóülepítőkből eltávolított - a biológiai tisztításkor keletkező - élő- és elhalt mikroorganizmusok tömege adja, kisebb része a mechanikai tisztítási fokozatban, az előülepítők fenekén felgyülemlett ún. nyersiszap. Az iszapot, nedvesség tartalmának csökkentését követően, leggyakrabban mezőgazdasági területekre helyezik el.

A települési szennyvizek kezelésének másik lehetősége az ún. *természetes szennyvíztisztítás*, amely azonban csak kétezer lakosszám alatti településeknél jöhet szóba. Környezetvédelmi- és gazdaságossági szempontból is előnyös, ugyanis csekély energia- és vegyszerfelhasználású, illetve nem termelődik szennyvíziszap.

Az ipari szennyvizek tisztítására számos eljárást dolgoztak ki a szennyvíz jellegétől függően: extrakció, oxidáció, adszorpció, bepárlás, kristályosítás vagy a szennyező anyagok kicsapása. A legkorszerűbb eljárások azonban ez esetben is mikroorganizmusok tevékenységén alapulnak.

5.4 Gyógyszermolekulák megjelenése a felszíni vizekben

Az 1970-es években számoltak be először arról, hogy gyógyszermolekulák mutathatók ki a vízi környezetben [8-10]. Elsősorban kezelt szennyvizekből mutattak ki szteroid hormonokat, illetve klorofibrinsavat $\mu\text{g/l}$ -es koncentrációban, India, Németország és az USA területén. Ezt követően, 1981-ben Richardson és Bowron folyóvízből is kimutatott különböző gyógyszereket, az Egyesült Királyság területén [11].

Köszönhetően az analitikai technológia fejlődésének is, az 1990-es évektől egyre több publikáció jelent meg, amelyek a gyógyszermolekulák meghatározásával foglalkoztak szennyvizekből, talajvízből, illetve felszíni vizekből is [12-26]. Ezek között a leggyakrabban vizsgált gyógyszer-csoportok a következők voltak: koleszterinszint-csökkentők, fájdalomcsillapítók, antibiotikumok, fertőzés gátló szerek, hormonok, kemoterápiás szerek és béta-blokkolók.

A gyógyszermolekulák felszíni vizekbe jutása elsődlegesen a kezelt szennyvízen keresztül történik [27]. Miután az emberek alkalmazzák gyógyszereiket azok egy része átalakulás nélkül, míg másik részük különböző biotranszformációs lépés útján átalakulás után ürül a szervezetből és bekerül a szennyvízbe. Ezen kívül - a nem megfelelő hulladékkezelésnek köszönhetően - a lejárt, vagy már nem szükséges gyógyszerek a WC-n lehúзва, vagy a mosdón keresztül leöblítve is bekerülnek a szennyvízbe. Azonban a szennyvíztisztítási eljárások nem képesek teljes mértékben lebontani ezeket a molekulákat [28-31], amelyek így kikerülnek a tisztított vízzel együtt a patakokba, folyókba.

A szennyvíztisztítási eljárások hatékonysága, ezáltal a felszíni vizekbe kikerülő gyógyszerek mennyisége nagymértékben függ az alkalmazott technológiától, a komponensek fiziko-kémiai tulajdonságaitól, illetve az időjárási viszonyoktól (csapadék mennyisége, hőmérséklet, napsütés) [32]. Több tanulmány is foglalkozott a szennyvíztisztítási eljárások hatékonyságának vizsgálatával, melynek során megmérték a különböző komponensek koncentrációját a telepre befolyó, illetve az onnan kifolyó vízben és a különbségekből kiszámították a technológia „gyógyszer-eltávolító” hatékonyságát [32-38]. A kapott adatok alapján egyértelműen megállapítható, hogy az eljárások nem képesek eltávolítani a gyógyszer molekulákat teljes mértékben, azonban gyógyszer-csoportonként is jelentős eltérés figyelhető meg a hatékonyságot illetően. A nem-szteroid alapú gyulladáscsökkentők eltávolításának hatékonysága 20 – 99 %, a H_2 -receptor

anatonistáké 20 – 60 %, az antiepileptikus szereké 0 – 30 %, az antibiotikumoké 30 – 75 %, a koleszterinszint csökkentőké 50 – 80 %, míg a béta-blokkolóké 20 – 60 % között változott molekulától függően [32-38].

Továbbá egyes megfigyelések szerint a metabolizáció második fázisában keletkező konjugátumok képesek visszaalakulni az aktív komponenssé mikroorganizmusok hatására [20, 39-42], míg előfordulnak olyan „balesetek” is, melyek során tisztítatlan szennyvíz kerül egyenesen a felszíni vizekbe, illetve csatornázatlan településeken diffúz szennyezés révén a talajvízen keresztül is elérhetik azokat [43].

Azonban arról sem szabad megfeledkeznünk, hogy az alkalmazott gyógyszereink egyes metabolitjai is mutatnak bizonyos fokú biológiai aktivitást, főleg az ún. „pro-drug”-ok esetén, ahol az aktív komponens maga a metabolit, továbbá egyes metabolitok kifejezetten toxikus tulajdonságokkal bírnak.

A már a felszíni vizeinkbe került gyógyszerek sorsát nagyban befolyásolják azok fiziko-kémiai tulajdonságai – például a vízdoldhatóság, a gőznyomás vagy a polaritás – [44], illetve a felszíni víz zavarossága, mélysége, pH-ja, továbbá a napsütéses órák száma, ami évszakonként változó [21].

Az első változás a jelentős hígulás, melynek hatására a komponensek már csak nyomokban (ng/l-es koncentrációban) találhatók meg a felszíni vízben [43], illetve az esetleges adszorpció a különböző kolloidális részecskéken, az oldott szerves anyagokon, illetve az üledéken [45]. Azonban ezek hatására a potenciális biológiai aktivitás, esetleges toxicitás veszélye még nem szűnik meg, hisz a komponensek még változatlan formában találhatók meg a vízben.

Ezzel szemben lejátszódhatnak különböző biológiai, kémiai, illetve fiziko-kémiai transzformációs reakciók, melyek során a komponensek elveszítik eredeti felépítésüket, biológiai hatásukat, de az is előfordulhat, hogy a keletkező transzformációs termék is rendelkezik valamilyen biológiai hatással, esetleg toxikus is [46-47]. Továbbá lejátszódhat közvetlen (fény abszorpció révén), illetve közvetett (különböző gyökök útján) fotodegradáció is, amelyre számos példát találunk az irodalomban [46-52].

Abból kiindulva, hogy a gyógyszereket alapvetően különböző biológiai hatások elérésére, mikroorganizmusok elpusztítására, illetve bizonyos fokú perzisztenciára tervezték, érthető miért is olyan fontos ezek mérése, követése a felszíni vizeinkben.

Számos olyan tanulmány jelent már meg, amelyben a felhalmozódó aktív vegyületek fejtettek ki negatív hatásokat a vízi élővilágra. Az első publikáció szerint, amely 2004-ben jelent meg, szokatlanul magas halálozási arány volt megfigyelhető Indiában és Pakisztánban keselyű fajoknál, amit a nagymértékben alkalmazott diklofenák, nem-steroid gyulladáscsökkentőnek tulajdonítottak [53]. Nagy port kavart az is, amikor megjelentek olyan tanulmányok, melyek szerint a környezetbe kikerülő, emberek által elfogyasztott hormon készítmények (fogamzásgátló szerek), hatására a hím halak elnőiesednek, és szaporodásra képtelenné válnak [54].

Számos komponens esetén elvégeztek már akut toxicitás vizsgálatot, melyeket a fogyasztási szokások, a feltételezett toxikus hatások, illetve a perzisztencia mértéke alapján választottak ki. A leggyakrabban vizsgált gyógyszer-csoportok között szerepelnek a nem-steroid gyulladáscsökkentők, a béta-blokkolók, a neuroaktív vegyületek, a koleszterinszint csökkentők, illetve a citosztatikumok. Ezen vizsgálatok nagy részében azt tapasztalták, hogy csak jóval nagyobb koncentrációban fejtenek ki toxikus hatásokat, mint amilyen koncentrációban a felszíni vizekben megtalálhatók [44, 55]. Azonban a bioakkumuláció révén ezek a komponensek az élőlények szöveteiben felhalmozódhatnak, illetve bekerülhetnek a táplálékláncba is. Éppen ezért tartják sokan fontosnak hosszú távú, fajok egész életciklusát végigkövető vizsgálatok elvégzését, amiből eddig még csak elenyésző számú készült. Továbbá nem szabad elfelejtenünk azt a tényt sem, hogy a környezetben a komponensek keveréke jelenik meg. Egyelőre még nincsenek pontos adataink arról, hogy milyen befolyással vannak egymás hatásaira, de egyes tanulmányok szerint akár erősíthetik is egymás biológiai aktivitását, ezáltal még nagyobb veszélynek kitéve a vízi élővilágot.

De figyelembe véve azt a tényt, hogy egyes tanulmányok már ivóvízben is kimutattak gyógyszer hatóanyagokat [19, 43, 56-57] megállapítható, hogy nem csak a vízi élővilág van kitéve a „mérgezés” veszélyének. Bár meg kell jegyeznünk, hogy az ivóvízben kimutatott komponensek koncentrációja igen csekély, ami köszönhető a nagymértékű higulásnak, illetve annak is, hogy az ivóvíz előállítási technológiák hatékonyabbak, mint a szennyvíztisztítás során alkalmazottak.

Az Európai Unió már 1995-ben hozott egy rendeletet (Directive 92/18 EEC), amelyben ökotoxikológiai vizsgálat elvégzését írja elő minden újonnan forgalomba

hozandó állatgyógyászatban alkalmazott gyógyszer esetén, míg mindezt csak 2005 óta írja elő embergyógyászatban alkalmazandó gyógyszerek esetén (Directive 2001/83/EC) [55].

5.5 Elválasztástechnikai módszerek a vízanalitikában

5.5.1 Minta-előkészítés

A vizsgálandó minták megfelelő előkészítése több szempontból is fontos lépése a kidolgozott analitikai módszernek. A környezeti minták általános jellemzője, hogy a vizsgálni kívánt komponensek koncentrációja igen kicsi, illetve a minta jelentősen terhelt különböző zavaró anyagokkal. Előbbi probléma megoldására érdemes dúsítást végezni, míg utóbbi kiküszöbölésére különböző tisztítási eljárásokat alkalmazni. Ezen kívül a használandó nagyhatékonyságú készülékek védelme érdekében is célszerű a mintákat olyan állapotba hozni, hogy azok a készülék élettartamát ne rövidítsék jelentősen, továbbá esetenként szükségünk van ún. oldószerváltásra ahhoz, hogy az analitikai méréseket el tudjuk végezni.

Általános követelmény az alkalmazott minta-előkészítési módszerrel szemben, hogy minimális eszköz- és anyagigénye mellett, lehetőleg gyors, egyszerű és robusztus, illetve validálható legyen.

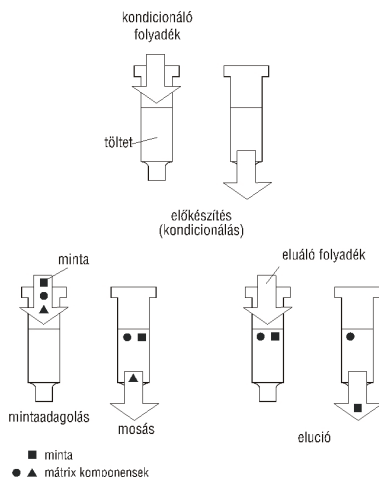
Az olyan laboratóriumokban, ahol szabványok szerint dolgoznak még ma is igen elterjedt a folyadék-folyadék extrakció (Liquid-Liquid Extraction, LLE) alkalmazása. Legegegyszerűbb módja a választótölcsérben elvégezhető, a minta oldatának és a vele nem elegyedő oldószernek a kirázása, melynek során a célvegyületek megoszlási hányadosuknak megfelelően átkerülnek a minta oldatából a másik oldószerbe. Ez az eljárás igen egyszerű és gyors, de nagyobb térfogatú, nyomnyi szennyezőket tartalmazó vízminták esetén nem a legcélravezetőbb. Az eljárás során leggyakrabban alkalmazott szerves oldószerek környezetszennyezők, megsemmisítésük nagy probléma.

Kutató laboratóriumokban viszont jóval elterjedtebbek a hatékonyabb, szelektívebb és nagymértékben automatizálható minta-előkészítési módszerek. Ilyenek például a szilárd-fázisú extrakció (SPE), a szilárd-fázisú mikroextrakció (SPME), a szilárd-fázisú töltetes mikroextrakció (MEPS), a gázkromatográfokkal összekapcsolt gőztéranalitikai (headspace) módszerek stb. Munkám során szilárd-fázisú extrakciót alkalmaztam a minták előkészítésére, ezért a továbbiakban csak ezt részletezem.

A szilárd-fázisú extrakció (Solid Phase Extraction, SPE) az egyik leggyakrabban alkalmazott minta-előkészítési módszer a vízanalitikában. Az eljárás viszonylag gyors és egyszerű. Lényege, hogy megfelelő körülményeket biztosítva – oldószer, polaritás, pH, ionerősség, stb. – a minta oldata kölcsönhatásba kerül az alkalmasan megválasztott szilárd fázissal, és a minta komponensei különböző erősséggel kötődnek a szilárd fázishoz. Ezt követően egy alkalmasan megválasztott oldószer segítségével a minta különböző komponensei egymástól elválasztva oldhatók le a szilárd fázisú töltetről. Az eljárás alapvetően kétféleképpen valósítható meg: az egyik eljárásban a szilárd fázisú tölteten megkötődnek a célkomponensek, míg a minta zavaró komponensei nem, vagy olyan erősen, hogy az elúciókor sem távoznak; míg a másik esetben a minta zavaró komponensei kötődnek meg a tölteten, és a célkomponensek nem. Mindkét eljárás során megvalósul a minta tisztítása, azonban az első módszerben lehetőségünk van a minta célkomponenseinek dúsítására is, ezért ezt gyakrabban is alkalmazzák. Lépéseit – amit az 1. ábra szemléltet - az alábbiakban részletezem:

- 1) Az eljárás első lépéseként a szilárd fázisú töltetet kondicionáljuk egy jól nedvesítő, szerves oldószerrel, melynek jelentősége, hogy a töltet funkciós csoportjai aktív, kémiai kötés kialakítására alkalmas állapotba kerülnek. Leggyakrabban alkalmazott oldószerek a metanol, a hexán, az aceton, az etil-acetát, esetleg az acetonitril.
- 2) A második lépés az ún. ekvibrálás, melynek során a mintával megegyező tulajdonságú oldószerrel mossuk át a szilárd fázisú töltetet. Ennek lényege, hogy a töltetet felkészítjük a minta felvitelére. Vízminták esetén ilyenkor ioncserélt vizet, a minta pH-állítása esetén, ugyanazon pH-ra beállított ioncserélt vizet alkalmazunk.
- 3) Az ezt követő lépés a minta felvitele, melynek legfontosabb követelménye az alacsony áramlási sebesség beállítása, annak érdekében, hogy a töltet funkciós csoportjainak, illetve a minta célkomponenseinek legyen elég ideje a kölcsönhatás kialakítására.
- 4) A minta felvitelét követően lehetőségünk van egy ún. mosási lépésre, melynek során egy gyengébb oldószer segítségével eltávolítjuk a töltetről az esetlegesen megkötődött zavaró komponenseket, ügyelve arra, hogy a célkomponenseket ne távolítsuk el. Ez a lépés gondos optimalizálást kíván meg a feltételek teljesülése érdekében, ezért sokan inkább nem alkalmazzák.

- 5) Főleg vízminták esetén célszerű a minta felvitelét követően egy szárítási lépést beiktatni, annak érdekében, hogy az eluált oldatban minél kevesebb vízmaradék legyen, ami megnehezíti a bepárlási lépést. Ezt leggyakrabban 10-30 percig végezzük, folyamatos vákuum által keltett levegőáramlásban.
- 6) Végül, a minta-előkészítés utolsó lépése a megkötődött célkomponensek elúciója, amelyhez leggyakrabban metanolt használunk, de előfordulhat acetonitril, etil-acetát, hexán, aceton és diklórmetán is. Az elúciót kis térfogatú (1-5 ml) szerves oldószerrel végezzük, lehetőség szerint két külön lépésben, és igen lassan.
- 7) Amennyiben további oldószerváltásra, illetve dúsításra van szükségünk az eluátumot bepárolhatjuk nitrogén gázáram alatt, amit fűtéssel is elősegíthetünk.
- 8) A szárazra párolt mintákat pedig a dúsítás mértékéhez szükséges, de még kezelhető térfogatú, illetve az analitikai módszert kielégítő minőségű oldószerben visszaoldva a minták készen állnak az injektálásra.



1. ábra – A szilárd-fázisú extrakció lépései

Az előkészítés sarkalatos pontja a megfelelő szilárd fázisú töltet megválasztása, illetve a minta tulajdonságainak – pl. pH-jának – beállítása, amely hosszadalmas módszerfejlesztést igényel. Manapság a cégek előre gyártott, különböző kémiai tulajdonságú – poláris, fordított fázisú, ioncserélő - szilárd fázisú töltettel megtöltött

fecskendőket árulnak, különböző térfogatban (pl.: 1, 3, 6, 12 ml), illetve töltettséggel (pl.: 10, 60, 150, 500 mg) (ld. 2. ábra). Amelyek közül a minta oldószerének és térfogatának, illetve a célkomponenseknek és azok várható koncentrációjának függvényében tudjuk kiválasztani a számunkra megfelelőt.



2. ábra – Különböző méretű SPE patronok

Különösen nagy mintaszám esetén ún. vákuumkádat használunk (ld. 3. ábra), melyek segítségével párhuzamosan 10-12 minta is előkészíthető. Továbbá nagyobb mintatérfogatok esetén lehetőség van PTFE-csövek alkalmazására (ld. 3. ábra), melyeken keresztül a minta felvitel folyamatosan, felügyelet nélkül is elvégezhető.



3. ábra – SPE vákuumkád PTFE csövek alkalmazásával a minta felviteléhez

5.5.2 Analitikai módszer

A minta-előkészítést követően szükségünk van a komponensek nagyszáma miatt azok nagyhatékonyságú elválasztására, amelyre leggyakrabban kromatográfiás módszereket alkalmazunk. A kromatográfiás elválasztás alapja a komponensek két fázis közötti ismételt megoszlása, ahol az egyik fázis mozgásban van (áramló vagy mozgó fázis), míg a másik fázis helyhez kötött (álló vagy stationer fázis). A kromatográfiás módszerek csoportosítása leggyakrabban az áramló fázis halmazállapota szerint történik, ami lehet gáz, folyadék, illetve szuperkritikus fluidum. Az állófázis lehet egy csőbe töltve, vagy a cső belső falán rögzítve, vagy sík réteget alkotva. Ennek megfelelően beszélhetünk oszlop- vagy rétegekromatográfiáról, de a lejátszódó folyamatok azonos összefüggésekkel írhatók le. A kromatográfiában használatos oszlopok lehetnek töltetes, illetve kapilláris oszlopok [58].

A vízanalitikában egyes komponensek (pl.: PAH-ok, zsírsavak) meghatározására még ma is igen elterjedt a gázkromatográfia alkalmazása, azonban az időigényes és sokszor nem megfelelő hatékonyságú, de poláris komponensek esetén szükséges származékképzés miatt egyre szűkül az alkalmazási területe. Míg a szuperkritikus fluid kromatográfia egyelőre kevésbé elterjedt módszer, illetve vízanalitikában eddig még nem fordult elő. Ma már jóval elterjedtebb az általam is alkalmazott folyadékkromatográfia, melyről a továbbiakban részletesebben is írok.

A **folyadékkromatográfia** (Liquid Chromatography, LC) a kromatográfiás módszerek azon fajtája, melynek során az anyagkeverékek elválasztása, különböző állófázisokon (tölteteken), folyadék halmazállapotú áramló fázissal történik. Előnye, hogy az elválasztás céljára az áramló fázisok (oldószerkelegyek) és állófázisok, valamint az elválasztási mechanizmusok nagy változatossága és sokoldalú kombinációja alkalmazható, ami lehetővé teszi az anyagkeverékek széles spektrumú vizsgálatát.

A folyadékkromatográfiás rendszerek technológiai megoldásai alapján lehetnek sík elrendezésű, azaz papír- vagy rétegekromatográfiás, illetve oszlopkromatográfiás eljárások. Túlnyomó részben az állófázis szilárd halmazállapotú, de speciális esetben (megoszlási kromatográfia) az állófázis a szilárd hordozó szemcsék felületén kialakított folyadékréteg, és az elválasztás mechanizmusa a folyadékfázisok közötti megoszlási egyensúlyokon alapul. Az elválasztandó anyag és a szilárd állófázisok között kialakuló kölcsönhatások alapján a folyadék-szilárd fázisú kromatográfiás módszerek adszorpcióis, kötött (normál és

fordított, NP és RP) fázisú, ioncserélő (IEX), molekulaméret szerinti (gélkromatográfia, SEC-GPC), hidrofób kölcsönhatású (HIC), affinitási és egyéb (királis – zárvány, fémkomplex, stb.) elválasztási mechanizmusok szerint csoportosíthatók. A nagyhatékonyságú elválasztások elvégzésére elsősorban a kötött fázisú, oszlopkromatográfias módszereket használják, ezért a továbbiakban csak ezeket részletezem.

A folyadékkromatográfias rendszer legfontosabb elemei a következők: eluensek/oldószerkegyek (mozgófázis), folyadékpumpa, buborékmentesítő (ún. degasser), mintaadagoló vagy injektor, termosztálható oszloptér, kromatográfias oszlop, detektor, illetve a vezérlő- és adatgyűjtő rendszer.

A folyadékkromatográfiában a kifejlesztés módja szerint elúciós, frontális és kiszorításos módszerek különböztethetők meg. A leggyakrabban alkalmazott elúciós kromatográfia lényege, hogy az elválasztandó anyagok oldatát egy alkalmasan megválasztott folyadékfázissal az elválasztás céljára megfelelő állófázison keresztül áramoltatják. Az elválasztandó anyag összetevői az állófázissal kölcsönhatásba lépnek és megoszlási hányadosuknak megfelelően az álló és áramló fázis között különböző mértékben megoszlanak. A folyadékfázis áramlása során a folyamatosan megújuló megoszlási egyensúlyok eredményeként az állófázissal erősebb kölcsönhatásba lépő összetevők viszonylag elmaradnak, míg a gyengébben kötődők gyorsabban haladnak. Így a minta összetevőinek áramlási sebessége különböző lesz és optimális esetben az állófázisról egymástól szétválva oldódnak le. Az elválasztás kifejlesztése kétféleképpen valósulhat meg: izokratikus elúcióval, amikor az alkalmazott mozgófázis összetétele az elválasztás során változatlan, illetve ún. gradiens elúcióval, melynek során a mozgófázis összetétele egy meghatározott program szerint változik.

A kötött fázisú oszlopkromatográfias elválasztások alapvetően két csoportba sorolhatók az állófázis és a mozgófázis polaritási viszonya szerint: a normál fázisú kromatográfiában (Normal Phase Liquid Chromatography, NPLC) az állófázis polárisabb a mozgófázisnál, míg a fordított fázisú kromatográfiában (Reversed Phase Liquid Chromatography, RPLC) a mozgófázis polárisabb, mint az állófázis. Mindkét esetben a kromatográfias oszlopok kémiaiilag stabil, mechanikailag szilárd, inaktív, homodiszperz méreteloszlású, szferoid hordozószemcsékre kovalens kötéssel rögzített különböző

szerkezetű és polaritású funkciós csoportokat tartalmaznak. Kezdetben a hordozó szilikagél volt, majd a stabilabb sziloxán-éter terjedt el. Mára már igen elterjedtek a szén alapú töltetek, továbbá alumínium-oxid, titán-dioxid, cirkónium-oxid, zeolit típusúak, illetve a jóval szélesebb pH-tartományban is használható szerves polimer alapú töltetek. A hordozószemcsékre felviitt funkciós csoportok normál fázisú kromatográfiában polárisak, leggyakrabban ciano (-CN), nitro (-NO₂), amino (-NH₂), dimetil-amino (-N(CH₃)₂) vagy diol (-OH), de előfordul a módosítatlan szilika állófázis használata is; míg fordított fázisú kromatográfiában apolárisak, leggyakrabban -C₂, -C₄, -C₈, -C₁₈, fenil (-C₆H₅), etil vagy izo-propil.

A folyadékkromatográfiás oszlopok hossza régebben 20, 25 vagy 30 cm volt, de manapság inkább 5, 10 vagy 15 cm-es oszlopokat használnak. A belső átmérőjüket tekintve lehetnek 1, 2,1, 3 és 4,6 mm-esek, míg a töltetek szemcseátmérője lehet 3, 5, illetve 10 µm, de manapság egyre inkább elterjedtek az ún. 2 µm alatti (sub-2 µm, STM) oszloptöltetek, melyek pontos mérete gyártónként eltérő. A töltetek pórusátmérője 100-300 angström között változik, gyártótól és felhasználási területtől függően. Azonban mára a porózus töltetek mellett megjelentek a héjszerkezetű töltetek is, melyek közepén egy kemény mag van, ami a molekulák számára nem átjárható és csak egy vékonyabb porózus réteg van a felületén. Ezáltal amellet, hogy az oszlop hatékonysága azonos vagy összemérhető a 2 µm alatti szemcseátmérőjű porózus töltetű oszlopokéval, jóval kisebb nyomásesés tapasztalható a kolonnán. Ezen kívül használnak még tömb-polimer alapú ún. monolit oszlopokat is, melyek alkalmazása esetén akár egy nagyságrenddel is csökkenthető a nyomásesés a kolonnán.

Normál fázisú kromatográfiában mozgófázisként apoláris oldószereket használnak, mint például etil-acetát, hexán, vagy diklór-metán; míg fordított fázis esetén poláris oldószereket, mint például metanol, acetonitril, tetrahidrofuran és víz, illetve különböző összetételű pufferek. Alapvető különbség a két technika között, hogy normál fázis esetén az elválasztást elsősorban az állófázis és a minta kölcsönhatása határozza meg, ezzel szemben fordított fázis esetén a mozgófázis tulajdonságai is meghatározóak.

A fentiekén túl elterjedőben van az ún. hidrofil kölcsönhatású kromatográfia (HILIC) használata is, ami elsősorban az erősen poláris, fordított fázisú tölteten kis retenciójú komponensek elválasztására nyújt lehetőséget. A HILIC gyakorlatilag egy normál fázisú

folyadékkromatográfiás elválasztási módszer, amely a fordított fázisú folyadékkromatográfia oldószerét alkalmazza. Állófázisa a normál fázishoz hasonlóan poláris – szilikagél vagy kötött diol, ciano, amino-propil fázis –, mozgófázisa egy vízzel elegyedő, aprotikus oldószer, rendszerint acetonitril. A HILIC vizet tartalmazó áramló fázisa a töltet felszínén egy állandó, vízben gazdag réteget tart fenn, ami különböző poláris kölcsönhatások kialakulása révén az elválasztandó anyagok szelektív megoszlását eredményezi.

Mára már szinte kizárólag fordított fázisú kromatográfiát használnak, ami elsősorban a jóval nagyobb állófázis választéknak köszönhető, ugyanakkor annak is, hogy az elválasztás során használt oldószerek kevésbé környezetszennyezők, ezek megsemmisítése vagy újrahasznosítása könnyebben és olcsóbban megoldható. Az oldószereket tekintve leggyakrabban az acetonitril - víz (/puffer) kombinációkat kedvelik, mert ellentétben a metanol használatával, kisebb a kolonnán tapasztalható nyomásesés. Mivel a környezetanalitikában általában sokkomponensű módszereket dolgoznak ki, ezért a gradiens elúció terjedt el jobban. Leggyakrabban C_{18} -alapú állófázisokat alkalmaznak, csak igen speciális esetben térnek át a C_8 -as alapúra. Alapesetben 5 – 10 cm-es oszlopokat használnak, 4,6 mm-es belső átmérővel, tömegspektrometriás detektor esetén inkább 2,1 mm-es átmérővel, míg az oszloptöltetek szemcseátmérője mára már javarészt 2 μ m alatti, amellyel hatékonyabb és gyorsabb elválasztás érhető el.

Azonban ez a gyorsaság és hatékonyság jóval nagyobb nyomásesést generál az oszlopon, melynek hatására mára már megjelentek az ún. ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC) rendszerek, amelyek akár 1200 bar nyomásesésig is alkalmazhatók. Természetesen az ilyen készülékekhez speciális – ezt a nagy nyomást elviselő – oszlopok is szükségesek, továbbá a módszerfejlesztés minden lépését jóval körültekintőbben kell elvégezni (pl.: eluensek szűrése, eltérő hőmérséklet és nyomásviszonyok hatása az oszlop belsejében, stb.).

Detektálási módszerek

A kromatográfiában alkalmazott detektorok olyan eszközök, amelyek az oszlopról elulálódó komponensek koncentrációjával arányos jelet szolgáltatnak. Jellemzésükre három paramétert használunk: a linearitási tartományt, az érzékenységet és a szelektivitást. A detektor linearitási tartománya az a koncentráció tartomány, ahol a jelintenzitás értéke

lineáris függvény szerint változik. A detektor érzékenysége definíció szerint a kalibrációs görbe meredeksége, azonban manapság egyre inkább az adott komponens kimutatási határával (LOD) jellemezzük. A detektor szelektivitása alatt az egyes vegyületek csoportjaira való kiemelkedő érzékenységet értjük.

A folyadékkromatográfiában alkalmazott detektorok az áramló fázis halmazállapotát figyelembe véve rendszerint olyan átfolyó cellával (üveg, kvarc, műanyag) rendelkeznek, amelyek az átáramló eluens optikai, elektromos, stb. tulajdonságainak változását érzékelni és mérni képesek. Az optikai detektorok érzékenységet a jel erősítésén túl elsősorban a fénypút hossza és a detektorcella térfogata határozza meg. A leggyakrabban alkalmazott detektorok a következők:

1) *Ultraibolya-látható (UV-VIS) detektor*: A folyadékkromatográfiában leggyakrabban az ultraibolya és/vagy látható hullámhossz-tartományú fény elnyelésének elvén és mérésén alapuló detektorokat alkalmazzák. A detektálás elméleti alapját a Lambert-Beer törvény értelmében a detektorcellán átfolyó komponensek koncentrációjának és a mért abszorbananciának lineáris összefüggése adja. Az UV-VIS detektorok széleskörű elterjedése egyszerű csatlakoztatásuknak, illetve a detektálás univerzális és nem destruktív jellegének tulajdonítható. Szerkezeti felépítésük és teljesítményük alapján három fő típusba sorolhatók [58]: egy fényputas, állandó hullámhosszon működő fotométer; két- vagy többsatornás, változtatható hullámhosszú készülékek; illetve az ún. diódasoros detektorok (Diode Array Detector, DAD).

2) *Fluoreszcens detektor (FLD)*: Viszonylag egyszerű, nagyobb érzékenységű detektor, amely a gerjesztő fény elnyelésére és ettől eltérő hullámhosszú fényintenzitás kibocsátására alkalmas kötéstípussal és/vagy molekulaszerkezettel (π -elektronrendszerrel, aromás, többszörösen konjugált kettős kötésekkel) rendelkező vegyület kimutatására alkalmazható. A kimutatható vegyületek köre kiterjeszthető fluoreszkáló származékok képzésével. Működési elve a következő: a mérőcellát az elnyelési spektrum alapján megfelelő gerjesztő fényrel világítja meg, és a másodlagosan keletkező (emittált) fényintenzitást oldalirányúan (általában 90° -ban), az emissziós spektrum alapján kiválasztott optimális hullámhosszon méri. Általában xenonlámpát, vagy higanygőzlámpát használnak a gerjesztéshez. A FLD abszolút fénymennyiséget mér, és a derékszögű elrendezésnek köszönhetően, továbbá annak, hogy jóval kevesebb természetes

fluoreszcens anyag van, mint UV elnyelő, a háttér optikai zaja gyakorlatilag nullára csökkenthető, ami igen magas jel/zaj viszonyt eredményez [58].

3) *Törésmutató detektor (RID)*: Ez az egyik legkevésbé érzékeny detektor, amely a tiszta áramló fázishoz képest az eluens törésmutatóját, illetve annak aktuális változását méri. A detektor a két prizma alakú mérőcellán megtörő fény kimenő jelének összevetésével értékeli a törésmutató aktuális változását. Az eluens törésmutatója az oldószer tulajdonságán, az elválasztott anyagok minőségén és mennyiségén túlmenően a rendszer hőmérséklet-, nyomás- és áramlási viszonyait is függ, ez utóbbiak miatt nem alkalmazható gradiens elúció esetén. Továbbá a refraktív index általában nem lineárisan változik az oldott anyag koncentrációjával, ezért szükség van korrekciós tényezők alkalmazására.

4) *Fényszórás elvén működő detektor (ELSD)*: Alapvetően az áramló fázis oldott anyagtartalmát mutatja ki, tehát univerzális és nem specifikus. Érzékenysége és lineáris tartománya az UV-VIS detektorokénál kisebb, rendszerint más, specifikus detektorokkal együtt alkalmazzák. A detektor működése során az elválasztott anyagokat tartalmazó áramló fázist a készülékben elporlasztják, beszárítják, és a száraz permet megvilágításával a szórt fény intenzitását mérik. Optimális körülmények között a detektor jelének intenzitása az elporlasztott anyag szemcseméretétől, sűrűségétől és koncentrációjától függ. A módszer csak közepesen vagy gyengén illékony anyagokra, illetve csak illékony pufferekkel alkalmazható.

5) *Elektrokémiai és vezetőképességi detektor*: Mivel az elektroanalitikai detektálás előfeltételét - hogy a mérendő közeg, az áramló fázis vezetőképes legyen, elektroaktív anyagokat, ionos vagy ionizálható vegyületeket tartalmazzon – csak néhány vegyületcsoport (aminok, catecholaminok, szerves savak), vagy speciálisan az ionkromatográfia teljesíti, ezért erre a detektortípusra részletesebben nem térek ki.

6) *Tömegspektrometriás (MS) detektor*: Univerzális detektor, amely főleg a nyomanalitikában széleskörűen elterjedt. Részletesebben ld. a következő fejezetben (5.5.3).

5.5.3 A tömegspektrométer mint detektor

Mind a folyadékkromatográfiában, mind a gázkromatográfiában széleskörűen alkalmazott detektor, ami annak köszönhető, hogy univerzális, illetve lehetőséget ad a

komponensek megbízható azonosítására tömegspektrumuk alapján. A tömegspektrométerek nagy vákuumban ($10^{-6} - 10^{-8}$ kPa) működnek. Az oszlopról eluálódó komponensek az ionforrásban ionizálódnak, illetve különböző mértékben fragmentálódnak. A keletkezett ionok az analízátorban tömeg/töltés értéküknek megfelelően szeparálódnak, majd a detektorban mennyiségükkel arányos jelet szolgáltatnak.

A tömegspektrométer az alábbi egységekből áll: vákuumrendszer, mintabeviteli egység, ionforrás, ionoptika, analízátor, detektor, illetve a vezérlő- és adatfeldolgozó rendszer.

Vákuumrendszer

A tömegspektrométerek elengedhetetlen része a megfelelően működő vákuumrendszer, melynek köszönhetően elkerülhetők a kisülések, átvezetések a forrásban és a detektorban; a fűtőszálak elégeése; a belső alkatrészek szennyeződése; a megnövekedett háttér és végül, de nem utolsósorban a különböző ion – molekula reakciók lejátszódása. A vákuumrendszer két fő részre osztható: az elővákuumra ($10^{-2} - 10^{-1}$ Pa), amit általában rotációs szivattyú biztosít, illetve a nagyvákuumra ($10^{-6} - 10^{-8}$ kPa), amit diffúziós, vagy turbómolekuláris pumpa állít elő.

Mintabeviteli egység

A mintabeviteli egység feladata a minta bejuttatása a készülékbe, ami történhet közvetlenül, fecskendő beinjektálással, illetve elválasztástechnikai egységgel (GC, LC, CE) kombinálva is. A kombinált módszer előnye, hogy lehetőség van több komponens meghatározására, egymás mellett is, habár az elválasztás időigényes is lehet.

Ionforrás

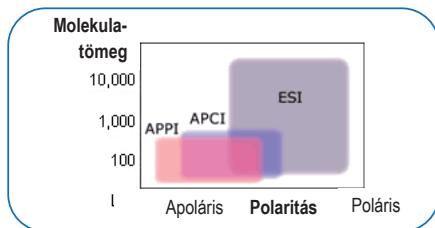
Az ionforrás elsődleges feladata a töltött részecskék előállítás, de esetenként jelentős fragmentáció is történik, ami szerkezeti információt, illetve azonosítási lehetőséget ad. Az alábbiakban csak a leggyakrabban alkalmazott ionforrásokra térek ki. A GC-MS kapcsolt technikák alkalmazott ionforrásai az elektron ionizációs, vagy régebbi nevén az elektronütöközéses ionizációs (Electron Ionization/Impact, EI) ionforrás és a kémiai ionizációs (Chemical Ionization, CI) ionforrás. Az LC-MS kapcsolt technikákban atmoszférikus nyomású ionizációt (Atmospheric Pressure Ionization, API) alkalmaznak,

ezen belül is leginkább az electrospray- (Electrospray Ionization, ESI), az atmoszférikus nyomású kémiai- (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) és az atmoszférikus nyomású fotoionizációt (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI). Megjegyzendő, hogy amennyiben LC-MS technikát használunk kizárólag illékony puffereket és adalékanyagot szabad alkalmazni az elválasztás során.

1) *Elektron ionizáció (EI)*: Az EI ionforrás lelke egy volfrám vagy rénium fűtőszál, amelyből elektronok lépnek ki, és haladnak az anód felé, miközben találkoznak a merőlegesen bejuttatott gázfázisú komponensekkel és ütköznek is velük. Az ütközés során az elektronfelhők átlapolása következtében elektron-vesztés, vagy elektron-befogás történik, ezáltal a molekulák ionizálódnak. Mivel ezek az elektronok igen nagy energiájúak (70 eV), ezért az EI ionizáció során intenzív fragmentáció is történik, ezáltal az EI spektrumban általában nem mindig látható molekulaion, hanem főleg a fragmensionok lesznek megfelelően intenzívek. Az EI ionizáció során mindig a molekulára jellemző, karakterisztikus spektrum keletkezik, ami megbízható azonosításra ad lehetőséget, köszönhetően a spektrumkönyvtáraknak. Emiatt is ennyire elterjedt ennek az ionizációnak a használata GC-MS technikákban [59].

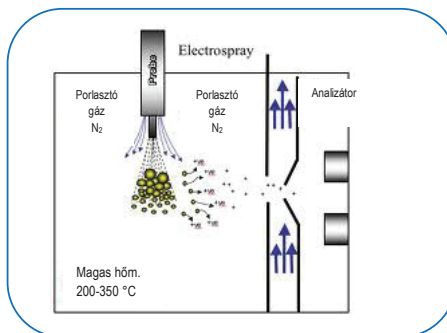
2) *Kémiai ionizáció (CI)*: A CI ionforrás nagyon hasonlít az EI ionforráshoz, azzal a különbséggel, hogy az ionizációs kamra kilépő rése keskenyebb, illetve a kamrába különböző reagens gázokat vezetnek be. Az ionizáció első lépésében a fűtőszálból kilépő elektronok a reagens gázt ionizálják, majd az ionizálódott reagens gáz ionizálja a gázfázisú molekuláinkat. Ez az ionizáció jóval lágyabb, mint az EI, a kapott spektrum jóval egyszerűbb, és mindig látható a molekulaion is. A leggyakrabban alkalmazott reagens gázok a metán, az izobután és az ammónia [59].

3) *Electrospray ionizáció (ESI)*: Az ESI a légköri ionizációs technikák legelterjedtebb ionforrása, ami köszönhető a széleskörű felhasználhatósági tartományának mind a molekulák polaritását, mind pedig azok méretét tekintve (ld. 4. ábra).



4. ábra – Léggöri ionizációs technikák alkalmazhatósági területei

Az electrospray ionizáció lelke egy kihúzott üvegkapilláris, amelynek aranyozott hegyére nagy feszültséget (kb. 1000 V) kapcsolnak, és a kapilláris eleje és vége között kialakuló feszültség-különbség kiszippantja a molekulákat a kapillárisból, amelyek eközben ionizálódnak is. Azonban ez a hagyományos electrospray technika csak igen kis áramlási sebességek esetén volt használható, ezért kidolgozták az ún. pneumatikusan segített electrospray-t, vagy másnéven ionspray-t, amit ma már kevesen különböztetnek meg a hagyományos electrospray-től. Ionspray esetében akár 1 ml/min-es áramlási sebességet is használhatunk, ami köszönhető az ötször-hatszor nagyobb feszültségnek a kapilláris végén, illetve a fűtött porlasztó- és szárítógáznak, amely az esetek nagy részében nitrogén gáz. Alapvetően az ionok már folyadékfázisban kialakulnak, és a porlasztás hatására nagyobb méretű töltött cseppek képződnek belőlük, amik a folyamatos ellenirányú szárítás hatására egyre kisebb méretűek lesznek, majd amikor a felületi töltéssűrűségük eléri a Rayleigh határt, akkor bekövetkezik a Columb-robbanás és apró, töltött részecskék, ionok keletkeznek, majd jutnak be az analízátorba.



5. ábra –ESI ionforrás felépítése

Az ESI ionizáció előnye, hogy többszörösen töltött részecskék is keletkezhetnek, ezáltal jóval szélesebb tömegtartományban alkalmazható, mint a többi ionforrás. Ezen kívül a közepesen poláris molekuláktól az egészen poláris molekulák ionizálására is alkalmas, ezért a legszélesebb körben használható. Kisebb hátránya, hogy jóval érzékenyebb az eluens-módosítókra és mátrix-komponensekre, mint a többi API technika, illetve csak kisebb koncentrációjú puffereket tolerál.

4) *Atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI)*: Ennek a technikának az alkalmazhatósága már korlátozottabb, ugyanis csak közepesen poláros és közepes méretű molekulák ionizációjára képes. Itt az ionizáció gázfázisban történik, ezért szükséges, hogy az ionizálandó molekulák bizonyos mértékű illékonyssággal rendelkezzenek. Az APCI ionizáció első lépése, hogy a koronakisülési elektródából elektronok lépnek ki, amik először a reagens gázt, ami ebben az esetben maga az eluens, ionizálják, majd ezek ionizálják a molekulákat addukt-képződés útján. Az APCI ionizáció során nagyobb hőmérsékletet alkalmazunk, ezért magasabb áramlási sebességet is tolerál, ugyanakkor a hőérzékeny komponensek degradálódhatnak is. Itt csak egyszerűen töltött ionok keletkeznek, ezáltal a kapott spektrum jóval egyszerűbb, ugyanakkor nincs lehetőség nagyméretű molekulák (peptidek, proteinek) vizsgálatára, ellentétben az ESI-vel.

5) *Atmoszférikus nyomású fotoionizáció (APPI)*: Ez az ionforrás nagyon hasonlít az APCI-ra, azzal az eltéréssel, hogy a koronakisülési elektróda helyett egy UV-lámpa fotonjai végzik az ionizációt. A direkt ionizáció során közvetlenül a molekulákat ionizálják a kilépő fotonok, míg a közvetett változatban először egy segédfolyadékot, ami általában

toluol, majd ezek ionizálják a molekulákat. Ez az ionforrás, csak apoláris molekulák ionizálására alkalmazható, illetve kisebb molekulaméret-tartományban használható, ugyanis itt is csak egyszerűen töltött ionok keletkeznek.

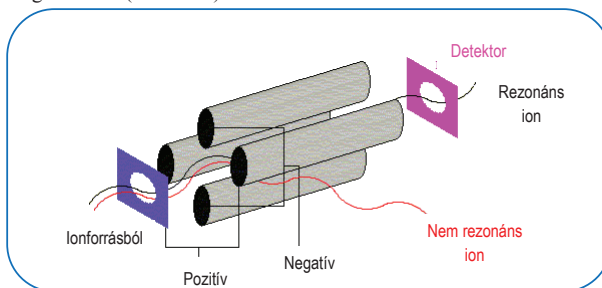
Ionoptika

Az ionforrásban képződő ionokat a különböző nagyságú potenciálokra kapcsolt ionoptikai lencsék gyorsítják, fókuszálják és juttatják az analizátorba.

Analizátor

Az analizátorok feladata az ionforrásban keletkezett töltött részecskék szétválasztása tömeg/töltés (m/z) szerint. Az alábbiakban csak a környezetanalitikában manapság alkalmazott analizátorokra térek ki, nem részletezem a régebbi szektor készülékeket, illetve a nagyon drága és igen ritka nagyfelbontású Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia és Orbitrap készülékeket.

1) *Kvadrupól analizátor (Q)*: A kvadrupól analizátor négy párhuzamos rúdból áll, melyekre egyen- és váltófeszültséget kapcsoltak. A két-két szemközti rudak azonos polaritásúak. A rudakra kapcsolt egyen- és váltófeszültségek által kialakított potenciál mindig csak egy adott m/z - értékkel rendelkező ion számára biztosít stabil pályát az előrejutásra, a többi ion belecsapódik a rudakba, majd a vákuumpumpák eltávolítják. Ahogy a feszültség-értékeket változtatjuk, úgy mindig más-más ion számára válik lehetővé az előrejutás, ezáltal van lehetőségünk egy adott tömegtartomány végigpásztázására (scan mód), vagy csak egy kiválasztott ion számára tesszük stabilá a pályát, és így szelektív ionkövetést végezhetünk (SIM mód).



6. ábra – Kvadrupól analizátor felépítése

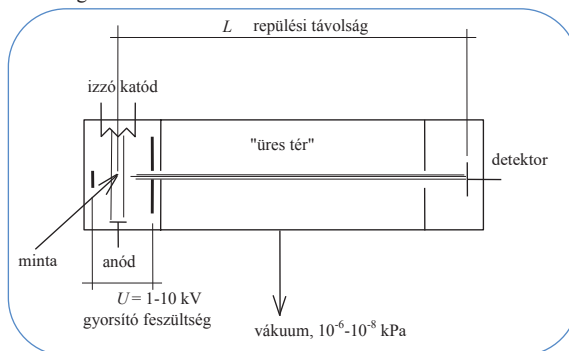
Több kvadrupól analizátor egymás utáni elhelyezésével (QqQ) tandem MS készülékhez jutunk, melyről bővebben az 5. pontban írok.

2) *Ioncsapda analizátor (IT)*: A hagyományos háromdimenziós ioncsapda analizátor egy kör alakú elektródából áll, amely tetején és alján is található egy-egy kupakszerű záró-elektroda, ezáltal az ionok egy háromdimenziós térbe vannak bezárva. Ebben az analizátorban, alapesetben a csapdában maradás minden ion számára stabil, és a detektáláshoz a készülék úgy változtatja a feszültség-értékeket, ami destabilizálja egy adott ion számára a bennmaradást, ezáltal az kirepül az analizátorból a detektorba. Tehát az IT analizátor működési elve pont ellentétes a Q analizátoréval. Érzékenysége az ionok csapdázásának köszönhetően nagyobb, mint a kvadrupól analizátoré. Ezzel az analizátorral lehetőségünk van az ionok fragmentálására, ezáltal tandem MS-ként is használhatjuk a készüléket. Ez a típusú tandem MS az ún. „tandem az időben”, ugyanis a csapdázott ionok közül kiválaszthatunk egyet (az összes többi iont destabilizáljuk, és kilökjük a csapdából), majd fragmentáljuk ugyanabban a térben. Ezt követően kiválaszthatunk egyet a fragmensionok közül és azt tovább fragmentálhatjuk, majd így tovább elvileg n-szer végezhetünk fragmentálást (MS^n funkció), azonban a gyakorlatban a harmadik-negyedik fragmentációt követően a keletkező ionok intenzitása már túl kicsi érdemi információ kinyeréséhez.

3) *Lineáris ioncsapda analizátor (LIT)*: Mivel a hagyományos háromdimenziós ioncsapdának vannak hátrányai az ionok kis térbe való bezárulása miatt, ezért kidolgozták a továbbfejlesztett változatát, az ún. kétdimenziós vagy lineáris ioncsapdát, amely tulajdonképpen egy kvadrupól analizátor, melynek elején és végén záró-elektrodák találhatók. Ezáltal az ionokat radiálisan a kvadrupól rudak elektromos tere, axiálisan a záró-elektrodák elektromos tere zárja be a csapdába. Detektáláshoz itt is destabilizálni kell az ionok számára a bennmaradást. Az ionok kirepítése a csapdából gyártótól függően történhet axiálisan, illetve radiálisan, bár ez utóbbi módszer ugyanúgy bír a hagyományos IT hátrányaival, mégis valamivel érzékenyebb annál.

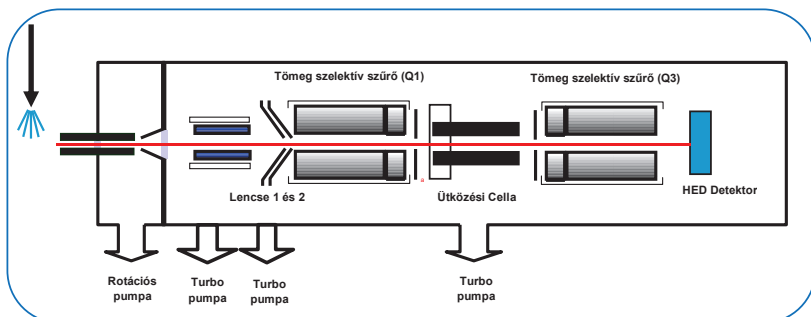
4) *Repülési idő analizátor (TOF)*: A repülési idő analizátorban az ionokat elektromos potenciál segítségével felgyorsítjuk, beleröpítjük egy repülési csőbe, és az azonos kinetikus energiával rendelkezők, eltérő tömegükkel arányosan eltérő sebességgel repülnek. Az analizátor azt az időt méri, amire az egyes ionoknak szükségük van a gyorsítás és a

detektálás közötti út – a repülési cső hossza oda-vissza – megtételére. A készülék ezt az időt nagy pontossággal méri, és a repülési cső ismert paramétereinek segítségével az ionok tömegét nagy pontossággal képes meghatározni. Éppen ezért ez az analízator kifejezetten alkalmas pontos tömeg meghatározására és elemanalízisre, azonban a kvadrupólhoz képest kisebb érzékenysége és szelektivitása miatt nem alkalmas nyomanalitikai mennyiségi meghatározások elvégzésére.



7. ábra – TOF analízator felépítése

5) *Hármas kvadrupól analízator (QqQ):* Ez az analízator elvileg három kvadrupól egymás utáni elhelyezésével jött létre, melyek közül csak az első és a harmadik végez tömegszűrést, míg a középső egy ütközési cella, ami manapság már nem is négy, hanem jellemzően hat rúdból áll. Ezáltal lehetőségünk adódik ún. „tandem a térben” MS méréseket elvégezni vele. A két tömegszűrőként használt kvadrupól ugyanúgy működik, mint ahogyan azt az 1)-es pontban részleteztem, míg a középső – az ütközési cella – lehetőséget ad kis mennyiségű inert gáz bevezetésével ütköztetést, fragmentációt létrehozni, vagy ha erre nincs szükségünk, akkor csak átengedi az ionokat az egyik tömegszűrőből a másikba.



8. ábra – Hármasszelekció analízátor felépítése

Mivel az első és a második kvadrupól tömegszelektív szűrőt is használhatjuk scan vagy SIM módban, QqQ analízátorral négy lehetséges mérési mód adódik, amit a 10. táblázatban foglaltam össze.

Mérési mód	Q1	Q3
Leányion ion scan mód (Product ion scan)	SIM	scan
Anyaiion ion scan mód (Precursor ion scan)	scan	SIM
Semleges-vesztés scan mód (Neutral loss scan)	scan	scan
Több reakciókövetési mód (Multiple reaction monitoring)	SIM	SIM

10. táblázat – Hármasszelekció analízátor lehetséges mérési módjai

A QqQ analízátor leggyakrabban alkalmazott mérési módja a több reakciókövetési mód, ismertebb nevén az MRM, melynek során lehetőségünk van egy anyaiion egy vagy több intenzív fragmensének kiválasztására, és ezek figyelésére. Ezzel a lehetőséggel rendkívül szelektív módszereket lehet kidolgozni, ami óriási segítség a jelentős háttérrel és zavaróanyagokkal terhelt környezeti minták esetén. Általában két átmenetet követünk, azaz egy anyaiion két legintenzívebb fragmensét választjuk ki, amelyek közül az intenzívebbet

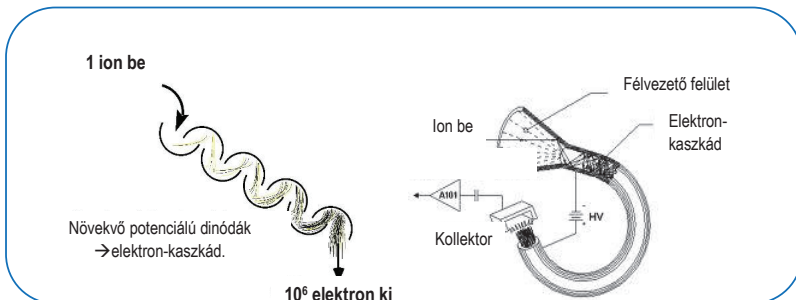
használjuk a mennyiségi meghatározások elvégzésére, míg a kevésbé intenzívet megerősítő ionként használjuk. Az analízis során, a megbízható azonosítás érdekében, figyelembe kell vennünk azt is, hogy a két átmenet aránya egy bizonyos intervallumon belül azonos legyen a standardban és a mintában is. Továbbá egyes molekulák esetén lehetőségünk van egy harmadik átmenet figyelésére is, ami még megbízhatóbb azonosítást tesz lehetővé.

6) *Hibrid készülékek:* Az utóbbi időben egyre inkább elterjedtek a különböző analizátorok kombinációi, az ún. hibrid készülékek. Ezeknek a készülékeknek számos előnye van, mivel a különböző analizátorok kombinációjával azok előnyei is kombinálódnak, azonban általában túl drágák a rutinszerű használathoz. Környezetanalitikai mérések során eddig még csak a kvadrupól – repülési idő analizátor (QTOF) kombinációval találkoztam, amellyel lehetőség van a fragmensionok pontos tömegének meghatározására, ami főleg metabolitok kutatása, vizsgálata során nyújt óriási előnyöket, azonban a szokásos mennyiségi meghatározások elvégzésére kevésbé érzékeny, mint az MRM módban alkalmazott QqQ készülék.

Detektor

A detektor feladata a szétválasztott ionok érzékelése és a jel felerősítése. A tömegspektrométerekben általában ún. pontdetektorokat alkalmaznak, melyek fajtái a következők:

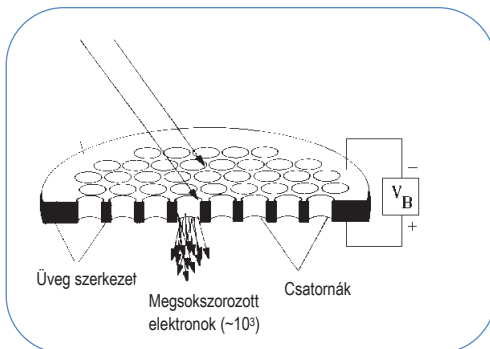
- 1) *Faraday-cella:* Ez a pontdetektorok legegyszerűbb formája, melynek működési elve, hogy a töltött részecske becsapódik a cellába, melynek hatására elektron emittálódik, ami áramot indukál, és ezt az áramot mérjük. Ezt a típusú detektort általában szektor-készülékekben használják.
- 2) *Elektronsokszorozó:* Ez a detektor több, egymáshoz képest különböző potenciálon lévő elektródából áll. A becsapódó ion hatására elektronok lépnek ki, majd ezek becsapódnak a következőbe, amiből még több elektron lép ki, és így tovább haladva a jel folyamatosan felerősödik.
- 3) *Channeltron:* Működési elve azonos az elektronsokszorozóéval, csak ennek elrendezése kúrt alakú, melynek felszínén vezető anyag van, belső falán pedig potenciál gradiens. A becsapódó ion hatására elektronok lépnek ki, majd ezek becsapódásával folyamatosan egyre több elektron keletkezik.



9. ábra – Az elektronsokszorozó és a channeltron

4) *Fotoelektron-sokszorozó*: Ebben a detektorban az ionok egy konverziós dinóda hatására elhajlanak egy foszfor-lemez felé, ami fotont emittál az ion hatására. Ezt a fotont erősíti fel és detektálja a fotoelektron-sokszorozó.

5) *Mikrocsatornás lemez (Microchannel plate, MCP)*: Működési elve megegyezik az elektronsokszorozóéval, csak felépítésében különbözik. Gyakorlatilag egy vékony tálca-alakú detektorról van szó, amiben több apró henger alakú csatorna van kialakítva és ezekben a csatornában játszódik le az elektronsokszorozás. Ezt a detektort általában repülési idő analízátor esetén alkalmazták.



10. ábra – Mikrocsatornás lemez

Vezérlő- és adatfeldolgozó rendszer

A kifinomult számítógépes szoftverek a detektált nyers adatokat számunkra feldolgozható formába hozzák, ezen kívül lehetőséget adnak további kiértékelési, spektrum-kérési feladatok elvégzésére.

5.6 Gyógyszerhatóanyag maradványok kimutatásának módszerei

A gyógyszerek felszíni vizekből történő kimutatása és meghatározása több okból is igazi kihívás az analitikusok számára: ezek a komponensek viszonylag alacsony koncentrációban vannak jelen, nagymértékben polárisak, gyakran hőérzékenyek, továbbá különböző kölcsönhatásokba léphetnek a mátrix komponensekkel. Éppen ezért a nem-specifikus detektorokat (pl.: FID, UV) egyre inkább felváltották a tömegspektrométerek, köszönhetően a rendkívüli szelektivitásuknak és érzékenységüknek, továbbá az izotóp-jelzett belső standardek használati lehetőségének, amelyekkel mind a mátrix-hatásokat mind pedig az esetleges minta-előkészítési veszteségeket lehet kompenzálni.

Eleinte inkább gázkromatográfiás (GC) módszereket alkalmaztak a gyógyszerek kimutatására felszíni vizekből – az első, 1976-os publikáció is gázkromatográfia-tömegspektrometria kapcsolt technikát (GC-MS) használ [10] – ami elsősorban annak volt köszönhető, hogy a folyadékkromatográfias-tömegspektrometriás (LC-MS) módszerek még nem voltak elég kifinomultak a megfelelő analitikai módszer kidolgozásához. Mindössze egy bő tíz év múlva sikerült kidolgozni azt az ionizációs formát (ESI), ami lehetővé tette a nagyon poláris, hőérzékeny komponensek bejuttatását az LC-MS analizátorába. Mostanra azonban már rengeteg multi-komponensű módszert dolgoztak ki mind GC-MS/(MS), mind pedig LC-MS/(MS) készülékeken, főleg az alábbi gyógyszer-csoportokba tartozó komponensekre: nem-szteroid gyulladáscsökkentők, fájdalomcsillapítók, koleszterinszint-csökkentők, antibiotikumok, antiepileptikumok, hormonok, béta-blokkolók, lipidszint-csökkentők, hipnotikumok, röntgen kontraszt anyagok és stimulánsok.

Továbbra is nagymértékben alkalmazzak GC-MS módszereket a környezeti nyomanalitikában, ami elsősorban annak köszönhető, hogy a GC-MS készülékek már jóval elterjedtebbek a környezeti laboratóriumokban, rendkívül érzékenyek, illetve a jól ismert elektron ionizációs MS könyvtárak lehetővé teszik a komponensek gyors és megbízható azonosítását. Azonban egyik hátránya a GC-MS módszereknek, hogy a poláris komponenseket származékolni kell, ami nemcsak időigényes, de sokszor a nem megfelelő hatékonyságú származékolás miatt a mérés is meghiúsul, vagy nő a módszer bizonytalansága. Például hormonok mérésénél megfigyelték, hogy az 17α -etinil-ösztadiol trimetil-szilil és t-butildimetilszilil származéka akár a származékolási reakció során, akár a

kromatográfiás elválasztás során átalakulhat az öszt ron megfelelő származékává, ami jelentősen lerontja a módszer megbízhatóságát [60,61].

Viszont a megfelelő származékolást követően a GC-MS módszerek érzékenyek, költségkhatékonyak és alkalmasak rutin analitikára is. A származékolások során általában metilezés (pl. diazometánnal, metanol/bór-trifluoriddal), szililezés (*N,O*-bis (trimetilszilil)trifluoroacetamiddal [BSTFA], *N*-metil-*N*-(trimetilszilil)trifluoroacetamiddal [MSTFA], *N*-(terc-butildimetilszilil)-*N*-metiltrifluoroacetamiddal [MTBSTFA]), illetve acetilezés (különböző anhidridekkel) történik a poláris funkciós csoportokon (hidroxil-, karboxil- és amino-) a minta-előkészítést követően. A származékolási reakció hatékonysága nagymértékben függ az alkalmazott hőmérséklettől, a reakció idejétől, illetve a reagens minőségétől, amelyek megválasztását nemcsak reaktivitásuk, hanem a keletkező termék stabilitása is befolyásolja.

A leggyakrabban alkalmazott kromatográfiás oszlopok 5% fenil-metil-sziloxán alapúak (pl.: DB5, DB5 MS, HP5 MS). Jellemző méreteik: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, illetve speciális esetekben használnak hosszabb vagy királis fázisúakat is [62]. A vivőgáz az MS-re való tekintettel minden esetben hélium. Az injektálási térfogat 1 – 3 µl, split/splitless módban, illetve esetenként előfordul nagytérfogatú injektálás az alacsonyabb kimutatási határok elérése érdekében.

GC-MS módszerekben az esetek túlnyomó részében elektron ionizációt alkalmaznak a komponensek ionizálására, főleg az MS-könyvtárak felhasználása miatt. Esetenként előfordul kémiai ionizációs módszer is, például ösztrogének pentafluorbenzil származékainak negatív kémiai ionizációs meghatározására szennyvízben és felszíni vízben metán reagens gázzal [63, 64]. Leggyakrabban kvadrupól analízátorú MS készüléket alkalmaznak, általában full-scan módban, míg a mennyiségi meghatározáshoz a jóval szelektívebb és érzékenyebb SIM módszert használják, illetve ahol van rá lehetőség, ott egyszerre mérnek SIM/scan üzemmódban [62]. De van példa mágneses szektor analízátorú készülék alkalmazására is az irodalomban, diklofenák és ibuprofen meghatározására [16, 17].

Komplex mátrixok esetén (szennyvíz, szennyvíz-iszap) problémát okozhatnak a célkomponenséhez rendkívül hasonló tömegspektrumú koelválódó komponensek, és így megbízható azonosítás nem végezhető el. Az ilyen esetek elkerülésére, illetve megoldására

egyre inkább elterjedtek - a kvadrupól analízátor helyett – az ionscapdás analízátorú (IT) vagy a hármas kvadrupól analízátorú (QqQ) készülékek, melyekkel jóval érzékenyebb és szelektívebb GC-MS/MS mérések végezhetők el. Az ionscapdás készülékek már az 1980-as években megjelentek, melyek óriási előnye az ionok hatékony csapdázásának köszönhetően felvehető nagyon érzékeny full-scan spektrum, a nagy felbontás, és a többlépcsős fragmentálás lehetősége. Ehhez képest a hármas kvadrupól analízátorok, ahol a szelektív reakciókövetési módban (SRM) lehetőség van egy molekulaion több karakterisztikus fragmensének kiválasztására, ezáltal tovább növelve a módszer szelektivitását és érzékenységét, csak később jelentek meg, és jóval kevésbé terjedtek el. Míg az irodalomban nagyszámban találkozunk ionscapdás analízátorú GC-MS/MS készüléken elvégzett mérésekkel [pl.: 65-73], addig hármas kvadrupól analízátorú GC-MS/MS készüléket eddig még kevés esetben alkalmaztak [pl.: 61, 64]. Továbbá megjelent már a repülési idő analízátorú (TOF) GC-MS készülék is, de egyelőre még egyáltalán nem terjedt el a környezetanalitikában.

Az LC-MS és azon belül is elsősorban a tandem MS készülékek berobbanása a környezetanalitikába az atmoszférikus nyomású ionizációs technikák megjelenésének, főleg az electrospray ionizáció (ESI) kidolgozásának köszönhető [74], ahol az ionizáció folyadékfázisban történik, így nem degradálódnak a komponensek, nem szükséges a molekulák illékonyága, ezáltal jelentősen kibővült az ionizálható molekulák csoportja (ld. 4. ábra). Ezen kívül vannak olyan extrém poláris komponensek (pl. a béta-blokkoló atenolol és sotalol), amelyek csak LC-MS/MS készüléken mérhetők megbízhatóan, ugyanis a GC-MS méréshez szükséges származékolási reakció nem megy végbe teljesen, ezért a mérési eredmények rendszerint alulbecsülik a valódi koncentrációt [75]. Továbbá egy direkt összehasonlítás szerint a relatív standard deviáció kisebb LC-MS/MS használatakor, mint GC-MS használata esetén [75].

Elsősorban fordított fázisú kromatográfiás módszereket használnak különböző C_{18} - vagy C_8 -as állófázisok, illetve 2 mm belső átmérőjű oszlopok használatával, de nagyon poláris komponensek elválasztására alkalmaztak már HILIC oszlopot is [76]. A vizes eluensek általában ammónium-acetát, vagy –formiát alapú pufferek, míg a szerves fázis acetonitril vagy metanol, illetve ezek keveréke; és gyakran a szerves fázisban is található adalékanyag az ionizáció elősegítésére (ecetsav vagy hangyasav). Továbbá elterjedően

van az ultra-nagyhatékonyságú kromatográfia (UHPLC) használata is [77-84], melynek köszönhetően az elválasztás hatékonysága nő, az analízisidő csökken és a kromatográfias csúcsok is keskenyebbek, de a készülékek igen nagy nyomásnak vannak kitéve.

LC-MS módszerekben csak elvétve találkozunk az APCI alkalmazásával [85-87], szinte kizárólag az ESI ionizációt használják, amivel jóval szélesebb polaritás-tartományban ionizálhatóak a molekulák [88], azonban jóval érzékenyebb a mátrix-hatásokra. Gyakorlatilag az LC-MS(/MS) módszerek egyetlen hátránya, főleg ESI ionizáció esetén, a mátrix-hatásoknak köszönhető ionsuppresszió, illetve ionerősítés, bár APCI ionizáció használatakor csak ez utóbbit tapasztalták eddig [88]. Sajnos a mátrix-hatás teljesen nem szüntethető meg, csak csökkenthető intenzív tisztítási, mintaelőkészítési módszerekkel; hatékonyabb kromatográfias elválasztással; az extraktum injektálást megelőző hígításával; vagy az LC eluens MS-be juttatását megelőző ún. splittelésével. Illetve korrigálható standard-addíciós kalibrációval, vagy az ún. „matrix-matched” kalibráció alkalmazásával, amihez szükségünk van célkomponenset nem tartalmazó azonos mátrixú mintára, ami az esetek többségében nem áll rendelkezésünkre. Továbbá izotóp-jelzett belső standardek használatával is korrigálható némileg a mátrix-hatás, habár ezek beszerzése rendkívül költséges.

Az irodalomban előfordul egyszeres kvadрупól analizátorú LC-MS módszer is [89, 90], melynek során full-scan módban keresik a célvegyületeket, majd SIM módban határozzák meg azokat mennyiségileg. Mégis a leggyakrabban alkalmazott analizátor LC-MS/MS módszerekben a hármass kvadрупól (QqQ), és azon belül is szinte kizárólag a rendkívüli szelektivitást eredményező több reakciókövetési mód (MRM), melynek során egy adott komponens molekulaionjának két (vagy akár három) fragmensét követjük egyszerre, ezáltal elkerülhető a fals-pozitív eredmény, továbbá eleget teszünk az azonosítási követelményeknek is.

A készülék-gyártók fejlesztéseinek következtében LC-MS(/MS) oldalon is szélesedett a paletta. Köszönhetően a nagyérzékenységű full-scan MS/MS lehetőségeinek, az elérhető nagy jel/zaj arányának az ionsapda (IT) analizátorú MS készülékek is egyre jobban elterjedtek [91, 92]. Ráadásul a full-scan MS/MS felvételek megbízhatóbban alkalmazhatók komponensek azonosítására, mint az MRM felvételek, a jóval intenzívebb fragmensionok jelenlétének köszönhetően. További előnye az ionsapdás készülékeknek a

többlépcsős fragmentáció (MS^n), habár már MS^3 fragmentáció esetén is jóval nagyobb minta-mennyiségre van szükségünk a kívánatos jel/zaj viszony eléréséhez [62].

További fejlődésnek tekinthető a lineáris ioncsapdák (Q-LIT) megjelenése és alkalmazása, melyek óriási előnye az ún. információ-függő analízis (Information Dependent Analysis, IDA). Ennek alap lépéseként MRM - módban mérünk, melynek során, ha egy adott átmenet meghaladja a beállított küszöbértéket, akkor arról a komponensről a készülék felvesz egy ún. megnövelt leányion spektrumot („enhanced product ion”), amely alapján lehetőségünk nyílik spektrumkönyvtáras azonosításra is [93-98]. Természetesen ehhez az azonosításhoz csak a hasonló LC-MS/MS készülékkel felvett spektrumok használhatók fel, a GC-MS könyvtárak nem.

Köszönhetően a repülési idő analizátor (TOF) előnyeinek, mint például a nagy felbontás, a nagy tömegpontosság és a gyorsaság, a környezetanalitikában is előtérbe került a kvadrupól - TOF (QTOF) hibrid készülékek használata [82, 99]. Ezek óriási előnye, hogy full-scan felvételét követően pontos tömeg meghatározására van lehetőségünk, nemcsak az anyaiionra, hanem annak fraktumseire is. Egy összehasonlító elemzés szerint [100] mind koncentráció meghatározására, mind pedig valós pozitív találat elérésére ugyanolyan megbízható, mint a QQQ készülék. Habár egy másik publikáció szerint [99], amíg a keresett komponensekkel erősen szennyezett szennyvíz-mintára kiválóan és megbízhatóan alkalmazható a QTOF készülék, addig egy kevésbé szennyezett folyóvíz mintára, már szükség van egy megerősítő MRM mérésre QQQ készülékkel a megbízható eredmény érdekében.

Ami a minta-előkészítési módszereket illeti mára már szinte teljesen kiszorította a szilárd-fázisú extrakció (SPE) [17, 24, 25, 28, 34, 51, 66-71, 78-87, 89, 90, 94-99, 101] a régebbi, hagyományos folyadék-folyadék extrakciót (LLE) [25, 102-103]. Köszönhetően annak, hogy SPE-vel lehetőségünk van egy lépésben elvégezni egy nagymértékű dúsítást és tisztítást, továbbá kevesebb és kevésbé környezetszennyező oldószereket kell használnunk. Bár a legválogatosabb kémiai fázisú SPE töltetekkel találkozhatunk az irodalomban - C_{18} , nem-poláris, ioncserélő, polimer alapú – mégis a leggyakrabban alkalmazott az Oasis HLB (hidrofil-lipofil balance), amely képes azonos eljárással megkötöni poláris és nem-poláris komponenseket egyaránt, ami óriási előny egy sokkomponensű módszer esetén [34, 67, 71, 79, 83, 84, 87, 90, 94-99]. Ezen kívül az

utóbbi években megjelentek olyan publikációk is, amelyekben egyes komponensekre, illetve komponens-csoportokra kialakított, szelektív töltetű SPE módszereket használnak [84, 95]. Ezeknek a tölteteknek a működési elve nagyon hasonló a biológiából ismert ligandum – receptor kölcsönhatásokon alapuló módszerekéhez, amit a nevük is szemléltet: Molekuláris lenyomatú polimerek (Molecularly Imprinted Polymers, MIP). Azonban egyelőre még viszonylag kevés komponens-csoportra szelektív tölteteket állítottak elő, de ez folyamatosan bővül.

Egyes publikációkban találkozhatunk automatizált, on-line SPE alkalmazásával is [66, 85, 101, 104], amivel csökkenthető a módszer idő- és pénzigénye, illetve az emberi tényező csökkentésével a hibák száma is redukálható.

Továbbá az újabb polimer szorbenseknek köszönhetően a szilárd-fázisú mikroextrakció (SPME) is előtérbe került [105, 106], még LC-MS használata mellett is [107]. Ennek előnye, hogy jóval rövidebb ideig tart az extrakció és kevesebb oldószert igényel, mint az SPE.

5.7 A vizsgálatra kiválasztott komponensek

Az 5.1 és 5.2 pontokban részletezett okokból kifolyólag kardiovaszkuláris (C-csoport), illetve a tápcsatorna és anyagcsere betegségeire ható szerek (A-csoport) közül a gyomorsav-túltengést csökkentő gyógyszerek hatóanyagait választottam ki a vizsgálataim elvégzésére. A kiindulási alapot a 9. táblázatban összefoglalt 2006-os gyógyszereladási-statisztika szolgáltatta, amely szerint a legnagyobb mennyiségben eladott gyógyszerek hatóanyagai az ATC besorolás szerinti A, B, C és L csoportokba tartoztak.

Az A-csoport – Tápcsatorna és anyagcsere betegségek gyógyszerei – további alcsoportokra osztható [108]:

- Fogászati készítmények,
- *Savtermelés zavarával járó betegségek gyógyszerei*,
- Funkcionális gasztrointesztinális betegségek elleni szerek,
- Hányáscsillapítók és émelygés elleni szerek,
- Epe- és májbetegségek gyógyszerei,
- Hashajtók,
- Hasmenés-gátlók, valamint a bél gyulladásos és fertőzőes megbetegedéseinek gyógyszerei,
- Elhízás elleni szerek a diétás készítmények kivételével,
- Digesztívumok, beleértve az enzimkészítményeket,
- Antidiabetikus terápia,
- Vitaminok,
- Ásványi anyagok,
- Roboráló szerek,
- Szisztémás anabolikumok,
- Tápcsatorna és anyagcsere egyéb gyógyszerei.

Mivel a 9. táblázatban szereplő A-csoportbeli hatóanyagok mind a savtermelés zavarával járó betegségek gyógyszerei közé tartoznak, továbbá köztudott, hogy sok ember küzd savtúltengéssel, savas refluxszal, fekélyel, amelyekre ma már nem vény-köteles készítmények is kaphatók, ezért vizsgálataimhoz tovább szűkítettem az A-csoportot ezekre a készítményekre. További célkomponens-listaszűkítést is elvégeztem, ugyanis a

savtermelés zavarát kezelő gyógyszerek két nagy csoportra oszthatók, melyek egyike – az antacidumok – általában sószerű vegyületek, melyek pusztán semlegesítő hatásúak, a gyomorsavval elreagálnak, ezért a környezetbe nem kerülnek ki, arra nem károsak, így ezekkel nem foglalkoztam. A másik nagy csoportba a peptikus fekély és reflux betegség gyógyszerei tartoznak, amelyek eltérő hatásmechanizmusuk alapján két részre oszthatók.

A gyomor savtermelése alapvetően három különböző mechanizmus szerint valósulhat meg: az ízérző receptorok által kiváltott bolygóideg-izgalom; a gyomor falában található H^+/K^+ -ATP-áz, vagy más néven protonpumpa működése révén; illetve hisztamin hatására, ami a kettes-típusú (H_2) receptorra hatva sósavszekréciót indukál a gyomorban. Gyógyszeres befolyás elérésére csak ez utóbbi két esetben van lehetőség, ezért a peptikus fekély és reflux betegség gyógyszereinek két csoportja a H_2 -receptor antagonisták és a protonpumpa inhibitorok [109, 110].

Figyelembe véve a Magyarországon is forgalmazott készítmények hatóanyagait, a vizsgálataim elvégzésére négy H_2 -receptor antagonistát, illetve három protonpumpa inhibitort választottam ki, melyek adatait a 11. táblázatban foglaltam össze, illetve szerkezeti képleteik a *Függelékben* (10.1) találhatók.

Tekintve a kardiovaszkuláris szereket – C-csoport - ezek is további alcsoportokra oszthatók:

- Szívre ható szerek: szívglikozidok, antiaritmiás szerek, kardiális stimulánsok, értágítók;
- Vérnyomáscsökkentők: központi hatású adrenerg anyagok, perifériás hatású antiadrenerg anyagok, arteriolák simaizomzatára ható anyagok;
- Diuretikumok;
- Perifériás értágítók;
- Vazoprotektív szerek: aranyér elleni szerek, visszér kezelése, kapilláris-stabilizáló szerek;
- Béta-receptor blokkolók: szelektív és nem szelektív β -receptor blokkolók, α - és β -adrenerg receptor-blokkolók;
- Kalcium-csatorna blokkolók: szelektív Ca-csatorna blokkolók, főként érhatasokkal (dihidropiridin-származékok, DHP), illetve szelektív Ca-csatorna blokkolók, közvetlen szívhatásokkal (fenilalkil-származékok, benzothiazepin-származékok);

- A renin-angiotenzin rendszerre ható készítmények: ACE-inhibitorok önmagukban és kombinációkban, angiotenzin II antagonisták és ez utóbbiak kombinációi;
- Szérum lipidszintet csökkentő anyagok: koleszterin- és triglicerid-csökkentő szerek (HMG CoA reduktáz inhibitorok és fibrátok), kombinációk.

Vizsgálataim elvégzéséhez ebben az esetben négy különböző alcsoportba tartozó készítmények hatóanyagait választottam ki, amelyek adatai a 11. táblázatban, szerkezeti képletei a *Függelékben* (10.1) található. Az összesen tizenkilenc kardiovaszkuláris komponensből kilenc β -blokkoló, három szelektív Ca-csatorna blokkoló, három ACE-inhibitor és négy HMG CoA reduktáz inhibitor.

A béta-blokkolók a szimpatikus idegrendszer β_1 - és β_2 -receptoraira vannak hatással, melyek közül előbbiek főként a szívizomban, utóbbiak a hörgőkben és a vaszkuláris simaizomban helyezkednek el. A receptorok ingerlésének hatására a szívizomban megnyílnak a lassú Ca-csatornák, ezáltal megnő az intracelluláris Ca^{2+} -szint, ami izomösszehúzódást eredményez. A szelektív β -blokkolók csak a β_1 -receptorokra fejtenek ki hatást, míg a nem szelektívek mindkét receptor működését gátolják, ami esetenként légzőszervi és perifériás mellékhatásokat okozhat. Az általam kiválasztott komponensek közül öt szelektív-, három nem szelektív β -blokkoló, míg egy az α -receptorok működését is gátolja.

A szelektív Ca-csatorna blokkolók a leggyakrabban alkalmazott készítmények az angina és a hipertónia kezelésében. Alapesetben, ha ingerület éri az izomrostok sejtthártyáját, akkor a szarkoplazmás retikulumból Ca^{2+} szabadul fel, kötődik a troponin nevű izomfehérjéhez, ami kontrakciót indukál egy többlépcsős folyamatban. A Ca-antagonisták blokkolják a simaizomban és a szívizomban is a Ca^{2+} beáramlását a csatornákon keresztül, azonban az ún. DHP-származékok nagyobb gátló hatást fejtenek ki a simaizomzatban, mint a szívizomban (vaszkuláris szelektivitás), illetve a hatástartamuk is nagyobb, mint a nem-DHP származékoknak.

Az ACE-inhibitorok az angiotenzin konvertáló enzim működését gátolják. A vesében keletkező enzim, a renin, alakítja át az angiotenzinogént angiotenzin I-é, amit a fent említett enzim alakít át angiotenzin II-vé, aminek hatása gyorsan kialakuló rövid ideig tartó, vérnyomás-emelkedés. Az ACE-inhibitorok ezt a második lépést megakadályozva alkalmazhatók vérnyomás-csökkentőként. Alapvetően három csoportjuk van: az első

csoport tagjai maguk és metabolitjaik is aktívak; a második csoport tagjai ún. pro-drug-ok, és csak a máj enzimatis átalakításai révén válnak aktívvá; míg a harmadik csoportot a lisinopril egymaga alkotja, sajátos farmakokinetikai tulajdonságai miatt. Az általam vizsgált ACE-inhibitorok egyike a lisinopril, míg a másik kettő a pro-drug-ok csoportjába tartozik.

A lipidszint-csökkentő szerek alapvetően az érlelmeszesedés kialakulását, illetve csökkentését célozzák meg. Az érlelmeszesedés tulajdonképpen a koleszterin - ami fontos membránépítő és hormon-szintézis alapanyag – és az azt szállító lipoproteinek komplexeinek, kóros működés következtében történő, elszaporodása és felhalmozódása az erek falán, ami akadályt képez a véráram útjában, ezáltal szívinfarktushoz, szélütéshez vagy tüdőembóliához vezethet. A HMG CoA reduktáz inhibitorok a koleszterinszintézis egyik lépését gátolják, csökkentve a keletkező koleszterin mennyiségét, ezáltal a lerakódások esélyét is. Előnyük, hogy nem csak az LDL (alacsony sűrűségű lipoprotein)-koleszterint (ez az ún. „rossz-koleszterin”), hanem az össz-koleszterint és a triglicerideket is csökkentik, miközben mellékhatásuk igen csekély [109, 110].

A komponensek általános tulajdonságait tekintve mindegyik poláris, ezért esetleges GC-MS-mérésükhöz származékolásra lenne szükség. Továbbá minden komponens tartalmaz olyan bázikus jellegű funkciós-csoportot (-NH, -NH₂), amelyek savas körülmények között protonálódni képesek, ezáltal LC-MS készüléken pozitív ionizációs módban jól mérhetők.

Gyógyszer- csoport	Komponens	CAS-szám	Összegképlet	M _w (g/mol)	pK _a	logP _{ow}
H ₂ -receptor antagonisták	Cimetidin	51481-61-9	C ₁₀ H ₁₆ N ₆ S	252,4	6,8	0,4
	Famotidin	76824-35-6	C ₈ H ₁₅ N ₇ O ₂ S ₃	337,5	7,06	-0,64
	Nizatidin	76963-41-2	C ₁₂ H ₂₁ N ₅ O ₂ S ₂	331,5	2,1; 6,8	-0,43
	Ranitidin	66357-35-5	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₃ S	314,4	2,3; 8,2	0,3
Protonpumpa inhibitorok	Lanzoprazol	103577-45-3	C ₁₆ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S	369,4	3,92; 8,73	1,73
	Omeprazol	73590-58-6	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	345,4	4,0	2,23
	Pantoprazol	102625-70-7	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ O ₄ S	383,4	3,92; 8,19	2,05
Szelektív β-blokkolók	Acebutolol	3751-730-9	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₄	336,4	9,4	1,7
	Atenolol	29122-68-7	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	266,3	9,6	0,23
	Betaxolol	63659-18-7	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	307,4	9,4	2,81
	Esmolol	84057-94-3	C ₁₆ H ₂₅ NO ₄	295,4	9,5	0,42
	Metoprolol	37350-58-6	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	267,4	9,7	1,9
Nem-szelektív β-blokkolók	Oxprenolol	6452-71-7	C ₁₅ H ₂₃ NO ₃	265,4	9,5	2,1
	Propranolol	525-66-6	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	259,3	9,5	1,2
	Sotalol	3930-20-9	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	272,4	8,2; 9,8	0,2
α- és β-blokkoló	Carvedilol	72956-09-3	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	406,5	8,2	4,19
Szelektív	Amlodipin	88150-42-9	C ₂₀ H ₂₅ ClN ₂ O ₅	408,9	8,6	3,0
Ca-csatorna	Nifedipin	21829-25-4	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	346,3	2,7	2,2
blokkolók	Nimodipin	66085-59-4	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₇	418,4	2,8	3,05
ACE-inhibitorok	Enalapril	75847-73-3	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	376,5	2,97; 5,35	2,45
	Lisinopril	76547-98-3	C ₂₁ H ₃₁ N ₃ O ₅	405,5	2,5; 6,7	-1,22
	Ramipril	87333-19-5	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₅	416,5	3,7; 5,5	3,32
HMG CoA reduktáz inhibitorok	Atorvasztatin	134523-00-5	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅	558,7	4,46	6,36
	Fluvasztatin	93957-54-1	C ₂₄ H ₂₆ FNO ₄	411,5	4,6	4,85
	Lovasztatin	75330-75-5	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	404,5	13,49	4,26
	Szimvasztatin	79902-63-9	C ₂₅ H ₃₈ O ₅	418,6	13,5	4,68

11. táblázat – A vizsgált komponensek adatai

5.8 A vizsgált komponensek ismert metabolitjai

Egy új gyógyszer-hatóanyag kidolgozásakor széleskörű toxikológiai és metabolizmus-vizsgálatokat is el kell végezni, így az általam vizsgált komponensek ismert metabolitjainak - különböző biológiai mintákból (vér, szérum, vizelet) való - meghatározására is található irodalmi adat. Ezekből a publikációkból lehetőségem nyílt a komponensek ismert metabolitjait és esetenként azok aktivitását is összegyűjteni.

Általánosságban elmondható, hogy az I-es fázisú biotranszformáció során a hidroxiláció a leggyakoribb reakció, ami az általam vizsgált komponenseknél is megfigyelhető a β -blokkolók, illetve a HMG-CoA redukáz inhibitorok esetében [111-115]. Továbbá carvedilol esetén a funkciós csoportok lehasadása is jellemző átalakulás [113-114]. Ahogy azt az előző pontban is említettem az ACE-inhibitorok egy része ún. pro-drug, melyek esetében a hatóanyag a biotranszformációs lépést követően – nevezetesen hidrolízis útján - válik aktívvá. Ez megfigyelhető az enalapril \rightarrow enalaprilát [116], illetve a ramipril \rightarrow ramiprilát [117] átalakulásoknál. A gyomorsav-túltengést csökkentő szerek átalakulására is elsősorban a hidroxiláció a jellemző, azonban itt igen gyakori a molekulákban található kén atom oxidációja is, ami szulfoxidok, illetve szulfonok keletkezéséhez vezet, továbbá a kén atom redukciójával szulfidok keletkezése is gyakori [118-121]. Egyedül az amlodipin esetében nem lehet besorolni az átalakulási reakciókat az általános csoportosítás szerint, ugyanis ez a molekula rendkívül sokrétű átalakuláson mehet keresztül, melynek során húsznál is több különböző metabolit keletkezik [122].

A 26 komponensre nézve összesen közel száz metabolitról találtam említést az irodalomban, melyek mindegyikére jelen dolgozatomban nem térhetek ki teljes részletességgel, ezért az alábbiakban minden komponensre csak a legfontosabbakat emeltem ki [111-135].

H₂-receptor antagonisták

Cimetidin esetén Lukša és munkatársai [118] a kén atom oxidációjával keletkező szulfoxid-metabolitot és a ciano csoport amiddá alakulását említik fő reakcióként. Míg Iqbal és munkatársai [119] szerint a cimetidin 65-70 %-a változatlanul ürül ki a szervezetből, és a maradék főként hidroxil-metil-metabolitként.

Famotidin esetén Rahman és munkatársai [130], illetve Vincek és munkatársai [131] szerint is a hatóanyag 70 %-a változatlanul ürül ki a szervezetből, és csak kis mennyiség alakul át szulfoxid-metabolittá.

Nizatidin esetén a hatóanyag 60 %-a változatlanul ürül ki a szervezetből, és a két fő metabolit a szulfoxid-, illetve az N-dezmetil-nizatidin [132].

A ranitidin 70 %-a változatlanul ürül ki a szervezetből és csak kismértékű metabolizáción megy keresztül a hatóanyag, melynek során N-oxid-, S-oxid-, dezmetil- és furonsav-metabolitok keletkeznek [135].

Protonpumpa inhibitorok

A lansoprazol jelentős mértékben metabolizálódik a szervezetben. Főként a kén atom oxidálódik vagy redukálódik, illetve az aromás gyűrű hidroxilálódik, sőt ezen reakciók kombinációja is előfordulhat, melynek során szulfon-, szulfid-, hidroxilált-szulfon-, hidroxilált-szulfid- és hidroxilált-szulfenil-metabolitok keletkeznek [120].

Omeprazol esetén a piridinil csoport alifás hidroxilációja, illetve a kén atom oxidációja vagy redukciója a jellemző átalakulási folyamat. A keletkező leggyakoribb metabolitok a hidroxil-, szulfon-, hidroxilált-szulfon- és a szulfid-metabolit [121].

A pantoprazol teljes mértékben átalakul a májban. Gyakori reakció az O-demetilálást követő szulfát konjugáció, illetve az aromás hidroxiláció és a kén atom oxidációja vagy redukciója, melynek során szulfon-, szulfid-metabolitok és ezek hidroxilált változatai keletkeznek [121].

Béta-blokkolók

Az acebutolol jelentős mértékben átalakul egy aktív metabolittá, lánchosszcsökkenéssel. A keletkező metabolit a diacetolol [123].

Az atenolol mindössze 10 %-a metabolizálódik, melynek során két fő metabolit keletkezik: az α -hidroxilált-atenolol, ami megőrzi a hatóanyag aktivitásának 10 %-át és az atenolol glükuronid-konjugátuma [133], bár ez utóbbi már II. fázisú biotranszformáció, ún. konjugáció.

A betaxolol már nagyobb mértékben alakul át a szervezetben. Főként karboxilsav-származékok és α -hidroxilált-betaxolol keletkezik [111].

A carvedilol jelentős mértékben átalakul, melynek során rendkívül sokféle metabolit keletkezik. Gyakori a demetilálódás, az aromás hidroxiláció, a gyűrűhasadás és ezek kombinációja. A keletkező metabolitok, a teljesség igénye nélkül: dezmetil-, 4'-hidroxil-, 5'-hidroxil-, dez-carbazolil-, illetve dezmetil-dez-carbazolil-carvedilol. További érdekesség, hogy a 4'-hidroxifenil-metabolit tizenháromszor aktívabb, mint maga az anyavegyület [113-114].

Az esmolol fő metabolitja az észter csoport hidrolizációjával keletkező savszármazék [125].

A metoprolol főként hidroxilációval alakul át, de előfordul O-demetilálódás és egyéb átalakulás is. Az egyik leggyakoribb metabolitja az α -hidroxil-metoprolol [127].

Az oxprenolol nagymértékű átalakuláson megy keresztül a szervezetben. Főként dealkiláció, hidroxiláció, N-metilálás és N-acetilálás történik, melynek során a következő főbb metabolitok keletkeznek: 4-hidroxil-, dezizopropil- és dezallil-oxprenolol [134].

A propranolol is jelentős mértékben metabolizálódik a szervezetben, különböző oxidációs és hidroxilációs reakciók során. A legjelentősebb metabolitja a 4-hidroxil-propranolol, ami bizonyos mértékű béta-blokkoló aktivitással is bír [127].

Végül a sotalol 80-90 %-a változatlanul ürül ki a szervezetből [128], és említést sem találtam az irodalomban esetleges metabolitjáról.

Calcium-csatorna blokkolók

Az amlodipin rendkívüli mértékben metabolizálódik, főként dehidrogenáció, demetiláció, N-acetileződés és hidroxiláció játszódik le a molekulán [122]. A keletkező metabolitokat nem nevesítették Suchanova és munkatársai, viszont szerkezeti- és összegképleteket közöltek.

A nifedipin egy igen fényérzékeny komponens. Látható fény hatására nitro-zopiridin-, míg UV-fény hatására nitro-piridin-származék keletkezik belőle [124]. Ezen kívül a szervezetben is átalakul: a piridin N-atomjának dehidrogenációjával dehidronifedipin [124], illetve hidroxilációval 6-hidroximetil-nifedipin [122] keletkezik legnagyobb mértékben.

A nimodipin kb. 50 %-a metaboliként ürül a szervezetből. Gyakori a dihidropiridin gyűrű dehidrogenációja, a demetiláció, az alifás hidroxiláció, illetve az aromás nitro csoport redukciója is, azonban a keletkező metabolitok mindegyike inaktív [129].

ACE-inhibitorok

Az általam vizsgált ACE-inhibitorok közül a lisinopril változatlanul ürül ki a szervezetből, míg a másik két komponens ún. pro-drug, így az átalakulást követően válnak aktívvá. Az enalapril enalapriláttá [116], a ramipril pedig ramipriláttá [117] alakul át a májban és fejt ki hatását, majd ürül ki a szervezetből.

HMG-CoA redukáz inhibitorok

Az atorvasztatin két fő metabolitja az orto- és a para-hidroxilált származék, melyek a hatóanyaggal azonos aktivitásúak. Ezen kívül egy inaktív β -oxidált metabolit is keletkezik a molekulából [112].

A fluvasztatin fő metabolitja a dezizopropil-propionsav-fluvasztatin egy inaktív származék. Továbbá keletkezik még dezizopropil-fluvasztatin és kétféle hidroxilált származék is: az 5-hidroxil-fluvasztatin a hatóanyag aktivitásának 88 %-át, míg a 6-hidroxil-fluvasztatin annak 45 %-át őrzi meg [112].

A lovasztatin mindhárom fő metabolitja aktív metabolit. A 6'- β -hidroxil-lovasztatin a hatóanyag aktivitásának 60 %-át, a 3''-hidroxil-metabolit annak 15 %-át, míg a 6'-exometilén-lovasztatin annak 50 %-át őrzi meg [112].

A szimvasztatin három fő metabolitja közül kettő biztosan aktív, a harmadikról ezt még nem bizonyították. Megőrzi a hatóanyag aktivitásának 52 %-át a 6'- β -hidroximetil-szimvasztatin és annak 27 %-át a 6'- β -karboxil-szimvasztatin, míg egyelőre inaktívnak tekinthető a 6'-exometilén-szimvasztatin származék [112].

5.9 Ismeretlen metabolitok azonosítására alkalmas eljárások

Az irodalomban számos eljárást találtam ismeretlen metabolitok azonosítására vonatkozóan. Az eljárások nagyrésze pontos tömegmérésen alapszik, akár nagyfelbontású repülési idő analizátorú [136], vagy Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia (FT-ICR) analizátorú [137], akár kisfelbontású hármas kvadрупól analizátorú [138-140] készülékeket alkalmazva. Ezen kívül előfordul többszörös fragmentáció alkalmazását követő szerkezetazonosításon alapuló [141], izotóp-klaszter analízises [142], illetve radioaktív izotópjelzésen alapuló [143] eljárás is.

Perchalski és mtsai. már 1982-ben használták a QqQ különböző pásztázási módjait ismeretlen metabolitok azonosítására [144]. Módszerük három lépésből állt: felvették az anyavegyület leányion spektrumát, majd a biológiai extraktrumról készítettek egy anyaion scan-t és/vagy egy semleges-vesztés scan-t, végül a feltételezett metabolitról is készítettek egy leányion spektrumot. Ezen felvételek elkészítését követően és a biotranszformációs reakciók alapos ismeretében nyílt lehetőség az ismeretlen metabolitok azonosítására több esetben is [145-148].

Mára már megjelentek az ismeretlen metabolitok azonosítását megkönnyítő szoftverek (pl.: *MetaboLynx*, *Waters*) és alkalmazások (pl.: *MetaSite*, *Molecular Discovery*; *METEOR*, *Lhasa*) is [149], azonban ez a terület még mindig rendkívüli kihívásokat tartogat az analitikusok számára.

6. Célkitűzés

Munkám célja a hazánkban nagy mennyiségben fogyasztott, vényköteles gyógyszerek egyes csoportjainak (szívgyógyszerek és gyomorsav-túltengést csökkentő szerek) felszíni vizekben található hatóanyag-maradványainak mérésére alkalmas, sokkomponensű LC-MS/MS módszer kidolgozása volt. A módszerrel szemben támasztott követelmények: viszonylag gyors minta-előkészítés, ami nem igényel kezelhetetlenül nagy minta-térfogatot és viszonylag gyors analitikai mérési módszer, illetve kellően alacsony kimutatási határok elérése.

A módszer kidolgozását és validálását követően elsődleges célom volt annak alkalmazása Duna vízminták vizsgálatára.

Következő célom egy környezetterhelés-vizsgálat elvégzése volt. Ennek során Budapestet a budai oldalról körülvevő két legnagyobb patak (Aranyhegyi- és Hosszúréti-patakok) időbeli és térbeli feltérképezése volt a célom, az általam vizsgált gyógyszer hatóanyag-maradványok tartalmára nézve. Ezt, a két patakon összesen tizenegy - alkalmasan megválasztott - mintavételi ponton, a négy évszak egy-egy hónapjaiban történő mintavételezéssel, illetve - a torkolati minták eredményeiből és vízhozam számításokból - éves becsléseket elvégezve kívántam kivitelezni.

Végül, munkám hátralévő részeként célom volt az általam vizsgált hatóanyagok metabolitjainak felkutatása az irodalomban, majd az ismert metabolitok kimutatása predikciós, illetve megerősítése további LC-MS mérések elvégzésével.

7. Kísérleti rész

7.1 Felhasznált anyagok

A felhasznált nagy tisztaságú (>90%) standardek az alábbi forgalmazóktól származtak: Calbiochem (Darmstadt, Németország) [nimodipin, omeprazol], Dr. Ehrenstorfer GmbH (Németország) [atorvasztatin-Ca, sotalol*HCl], LGC Standards (Wesel, Németország) [lanzoprazol, lisinopril*2H₂O, lovasztatin, pantoprazol-Na, szimvasztatin], USP (Rockville, Maryland, USA) [fluvasztatin-Na] és Sigma-Aldrich Kft. (Magyarország) [acebutolol*HCl, atenolol, betaxolol*HCl, carvedilol, cimetidin, esmolol*HCl, metoprolol-tartrát, nifedipin, nizatidin, oxprenolol*HCl, propranolol*HCl]. További két standardet a Richter Gedeon Nyrt. (Magyarország) [amlodipin-bezilát, enalapril-maleát] és hármat a Wessling Nonprofit Kft. (Magyarország) [famotidin, ramipril, ranitidin*HCl] bocsátott a rendelkezésemre.

A deuterált belső standardeket a Sigma-Aldrich Kft. (Magyarország) [atenolol-d₇], az LGC Standards (Wesel, Németország) [cimetidin-d₃] és a CDN Isotopes [enalapril-d₅-maleát, lanzoprazol-d₄] forgalmazóktól szereztem be.

Oldószerként acetont (Suprasolv for GC, Merck), acetonitrilt (Lichrosolv Reag. Ph Eur gradient grade for LC, Merck), ammónia-oldatot (25%, pro analysi, Merck), ecetsavat (Suprapur, Merck), hangyasavat (Suprapur, Merck), n-hexánt (Suprasolv for GC, Merck), metanolt (Lichrosolv Reag. Ph Eur gradient grade for LC, Merck) és ioncserélt vizet (Milli-Q, Millipore Ltd., USA) használtam. A pufferek elkészítéséhez ammónium-formiátot és ammónium-acetátot (pro analysi, ACS Reag. Ph Eur, Merck) használtam.

A minták szűréséhez 3hw-típusú szűrőpapírt (Spektrum-3D, Magyarország) használtam.

7.2 Törzs- és kalibráló oldatok készítése

Atorvasztatin, fluvasztatin, lovasztatin és szimvasztatin standardokból acetonitrilben – ugyanis ezek metanolban nem stabilak [150, 151] -, minden további standardból, illetve a belső standardból metanolban készítettem 1 mg/ml-es törzsoldatot, félévente, amelyeket mélyhűtőben tároltam. A törzsoldatokból 10 µg/ml-es keverék oldatokat készítettem acetonitrilben, havonta, amelyeket szintén mélyhűtőben tároltam.

A kalibráló oldatokat minden mérési napon frissen készítettem a 10 µg/ml-es keverék oldatból, 10 % metanol – 90 % ioncserélt víz (v/v %) elegyével. Kezdetben hét pontos kalibrációt készítettem: 5, 10, 25, 50, 75, 100 és 300 ng/ml-es koncentrációban, majd a környezetterhelés vizsgálat során ezt kibővítettem tizenöt pontosra: 5, 50, 100, 300, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 2000, 3000, 4000, 5000 és 6000 ng/ml-es koncentrációban. Minden esetben a kalibráló oldatok mind a négy belső standardet 50 ng/ml-es koncentrációban tartalmzták. Az oldatok koncentrációja a minta-előkészítést követően elért ezerszeres dúsításnak köszönhetően ng/l-es mintakonzentrációnak felel meg.

7.3 A vizsgált molekulák tömegspektrometriás paramétereinek meghatározása

A tömegspektrometriás paraméterek meghatározását a huszonhat célkomponens és a négy belső standard egyedi, 5 µg/ml koncentrációjú oldatával végeztem el, az Agilent 6460 típusú ESI ionforrással felszerelt hármass kvadrupól (QqQ) analizátorú készülékén, amelyen a későbbiekben az LC-MS módszer is kidolgozásra került.

A tömegspektrometriás paraméterek, amelyek meghatározására szükség volt az MRM mérési mód kidolgozásához: a molekula anyaiionjának tömege az adott polaritási módban; a fragmentor feszültség, ami meghatározza az ionizált molekula hatékony bejutását a készülék analizátorába; a két legintenzívebb fragmension tömege és az ezek létrehozásához szükséges ütközési energia értéke. Ezek meghatározása során 50 % (acetonitril + 0,1 % ecetsav), illetve 50 % (ioncserélt víz + 0,1 % ecetsav) oldószerkombinációt használtam, 0,4 ml/min áramlási sebességgel, kromatográfiás oszlop nélkül. A minták bejuttatását Agilent 1200 RRLC rendszerrel végeztem, ZDV-egységen keresztül. Kiindulva abból, hogy a kiválasztott komponensek bázisos jellegűek, azaz tartalmazznak protonálható funkciós csoportokat, a meghatározásokat pozitív ionizációs módban végeztem el, habár ellenőrző méréseket végeztem negatív módban is, ami jóval kisebb intenzitású jeleket produkált, ezért ezekről részletesebben nem írok.

A paraméterek meghatározását általam megírt injektor programok segítségével végeztem el, melynek során a fragmentor feszültséget 50 és 160 V között, míg az ütközési energiát 0 és 50 V között változtattam, tízes, illetve ötös lépésként. Az optimális fragmentor feszültség meghatározására összehasonlítottam az adott komponens protonált

molekulaionjára kért extrahált ion-kromatogramok (EIC) intenzitását a különböző fragmentor feszültség értékek esetén, és minden esetben kiválasztottam a legintenzívebbet. A fragmensionok kiválasztása érdekében az összes ütközési energián kapott fragmensionok tömegére kértem EIC-t, amiből meghatároztam a két legintenzívebb fragmension tömegét és az azokhoz tartozó optimális ütközési energia értékeket (CE (V)). Minden komponens esetén két fragmensionot választottam ki, azaz minden molekulára nézve két átmenetet tudtam vizsgálni a mérések során. A két átmenet intenzitás arányát és az abból képezhető elfogadási intervallumot a szoftver számította ki minden egyes mérés során, a legnagyobb kalibrációs pont adataiból.

Az ionforrás működési paramétereit – szárítógáz, porlasztógáz, kapilláris feszültség – is optimaláltam annak érdekében, hogy a lehető leghatékonyabban valósuljon meg az oldószer szárítása, a molekulák ionizációja és az analizátorba való bejuttatása, ezáltal a legintenzívebb jelet kapjam a detektálás során. Az optimális értékeket a 12. táblázatban foglaltam össze.

Köpeny gáz hőmérséklete	350 °C
Köpeny gáz áramlási sebessége	11 l/min
Szárítógáz (N ₂) hőmérséklete	350 °C
Szárítógáz (N ₂) áramlási sebessége	10 l/min
Porlasztógáz (N ₂) nyomása	35 psi
Kapilláris feszültség	3500 V
Nozzle feszültség	1000 V

12. táblázat – Az ionforrás működési paramétereit

A komponens-specifikus MS paramétereket a 13. táblázatban foglaltam össze.

Komponensek	R _t	TS	FragV	MRM1	CE1	MRM2	CE2	MRM arány
Acebutolol	6,037	2	70	337,1>116	25	337,1>218	25	16,0
Amlodipin	6,946	2	100	409,1>238	10	409,1>294,1	10	55,4
Atenolol	1,629	1	130	267,1>144,9	25	267,1>190	20	45,6
Atenolol-d ₇	1,612	1	120	274,2>145	25	274,2>79,1	20	109,3
Atorvasztatin	8,082	2	120	559,4>440,3	20	559,4>466,2	15	14,8
Betaxolol	6,711	2	70	308,1>116,1	20	308,1>161	20	23,9
Carvedilol	6,880	2	150	407,1>224,1	25	407,1>283	20	81,8
Cimetidin	1,597	1	90	253,1>95	30	253,1>159	10	90,7
Cimetidin-d ₃	1,598	1	70	256,1>162,1	10	256,1>95,1	25	88,4
Enalapril	6,650	2	140	377,2>234,2	15	377,2>303,2	15	28,4
Enalapril-d ₅	6,637	2	120	382,2>239,1	15	382,2>308,2	15	39,4
Esmolol	6,265	2	100	296,1>219	15	296,1>254,1	15	26,8
Famotidin	1,551	1	60	338,1>189	15	338,1>155	30	52,9
Fluvasztatin	8,100	2	130	412,2>224	30	412,2>266,1	15	85,3
Lansoprazol	7,118	2	80	370,1>252,1	10	370,1>119,1	15	30,0
Lansoprazol-d ₄	7,107	2	90	374,1>252	5	374,1>123	20	36,7
Lisinopril	3,051	1	110	406,3>84,1	30	406,3>246,2	20	24,8
Lovasztatin	9,729	2	50	405,3>199,1	10	405,3>285,1	5	90,7
Metoprolol	6,119	2	140	268,2>116,1	15	268,2>74,1	20	93,8
Nifedipin	7,712	2	70	347,1>315,1	0	347,1>254,1	15	56,3
Nimodipin	8,466	2	70	419,2>343,1	5	419,2>301,1	25	56,6
Nizatidin	1,896	1	100	332,1>58,1	30	332,1>155	15	40,9
Omeprazol	6,680	2	100	346,1>198	10	346,1>136,1	30	46,7
Oxprenolol	6,391	2	110	266,1>72,2	15	266,1>116,2	15	31,5
Pantoprazol	6,899	2	110	384,2>200,1	10	384,2>138,1	30	91,6
Propranolol	6,588	2	90	260,1>116,2	15	260,1>183,2	15	71,6
Ramipril	7,139	2	120	417,3>234,2	25	417,3>130,1	25	22,3
Ranitidin	2,374	1	90	315,2>176,1	15	315,2>130,1	25	60,9
Szimvasztatin	9,746	2	80	419,3>199,2	5	419,3>285,2	5	89,3
Sotalol	1,748	1	100	273,1>255	5	273,1>133	30	60,8

* R_t – retenciósi idő (min); TS – időszegmens; FragV – Fragmentor feszültség (V); MRM1 – intenzívebb átmenet;

CE1- ütközési energia MRM1-nél (V); MRM2 – megerősítő átmenet; CE2 – ütközési energia MRM2-nél (V); MRM arány – a két átmenet aránya

13. táblázat – Komponens specifikus MS paraméterek

7.4 Az LC-MS módszer kidolgozása, az analízis körülményei

Tekintettel arra, hogy a vizsgált molekulák bázikus tulajdonságúak kiválasztottam egy kifejezetten bázisos molekulák hatékony elválasztására alkalmas folyadékkromatográfiás oszlopot: Zorbax Eclipse Plus C₁₈. Az oszlop dimenzióinak megválasztása során figyelembe vettem a következőket: tömegspektrométer alkalmazása esetén kisebb átmérőjű oszlop használata javasolt (2,1 mm); az utóbbi időben széles körben elterjedt, kisebb szemcseátmérőjű oszlopok használatával hatékonyabb elválasztás érhető el (1,8 µm); illetve a nagyobb felbontás érdekében a hagyományosnál ugyan rövidebb, de mégsem túl rövid oszlop használata javasolt (100 mm).

Tekintettel a sok komponensre gradiens elúciót dolgoztam ki, melyhez a kolonnán tapasztalható kedvezőbb nyomásesés értékek miatt acetonitrilt választottam szerves fázisként, míg vizes fázisként a stabilabb retenciós idők elérése érdekében különböző illékony puffér-oldatokat teszteltem. Az illékony puffér-oldatok használatára a tömegspektrométer miatt, míg a maximum 10 mM-os koncentráció alkalmazására az ESI ionforrás alkalmazása miatt volt szükség. A vizsgált pufferek: ammónium-acetát/ecetsav és ammónium-formiát/hangyasav; 3,0; 3,5 és 5,0-ás pH értéken.

A kolonna termosztát hőmérsékletét a kisebb nyomásesés és a gyorsabb elválasztás érdekében - a kiválasztott oszlopon alkalmazható maximális hőmérsékletet is figyelembe véve - kezdettől fogva 50 °C – on tartottam. Továbbá tekintettel az ESI ionforrás koncentráció-érzékenységre kiválasztottam egy kis áramlási sebességet (0,25 ml/min), és az elválasztás optimalása során végig ezzel dolgoztam.

A nagyobb komponens-szám miatt az elválasztást két időszegmensre bontottam. Mindkettőben csak a komponensek egy részét követte a készülék, így nagyobb értékeket tudtam beállítani az egyes átmenetek követésére („dwell time”), ami lehetővé tette a megfelelő adatgyűjtést az analízis során. Az első időszegmensbe az atenolol-d₇ és cimetidine-d₃ belső standardeként kívül az alábbi, kisebb retenciójú komponensek kerültek: atenolol, cimetidin, famotidin, lisinopril, nizatidin, ranitidin és sotalol; míg a másik két belső standard és a többi 19 komponens a második szegmensbe került. A két időszegmensben található eltérő komponens-szám miatt eltérő dwell time-ot alkalmaztam: 50 ms az első esetben és 25 ms a második esetben.

Az alkalmas eluens-kombináció kiválasztása érdekében három rendszert teszteltem, amelyeket a 14. táblázatban foglaltam össze.

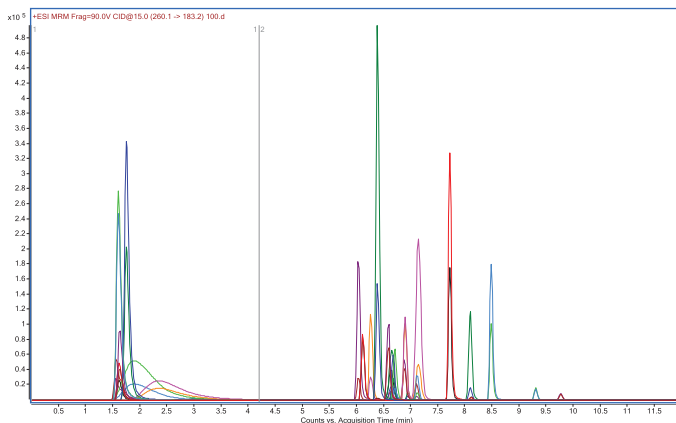
Rendszer	A eluens	B eluens
1	10 mM NH_4 -formiát, $\text{pH} = 3,0$ (HCOOH)	ACN + 0,1 % HCOOH
2	10 mM NH_4 -acetát, $\text{pH} = 3,5$ (CH_3COOH)	ACN + 0,5 % CH_3COOH
3	10 mM NH_4 -acetát, $\text{pH} = 5,0$ (CH_3COOH)	ACN + 0,15 % CH_3COOH

14. táblázat – Tesztelt eluens-kombinációk

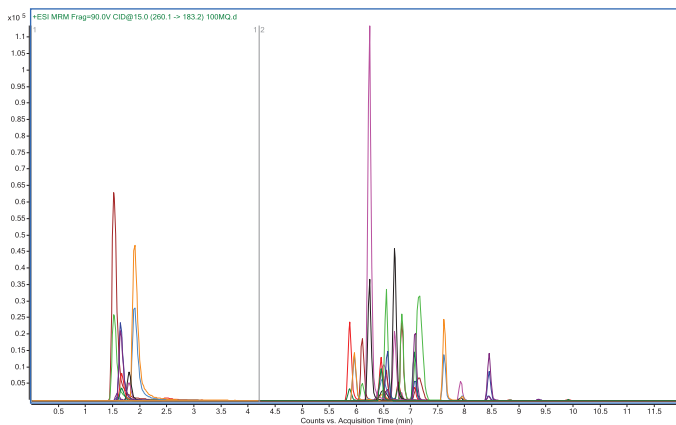
A teszt során gradiens elúciót alkalmaztam, melynek felépítése a 15. táblázatban található, a kapott kromatogramok pedig a 11. – 13. ábrákon láthatók.

Idő (perc)	% B eluens
0	10
4	80
8	100
12	100
Ekvilibrálási idő: 8 perc	

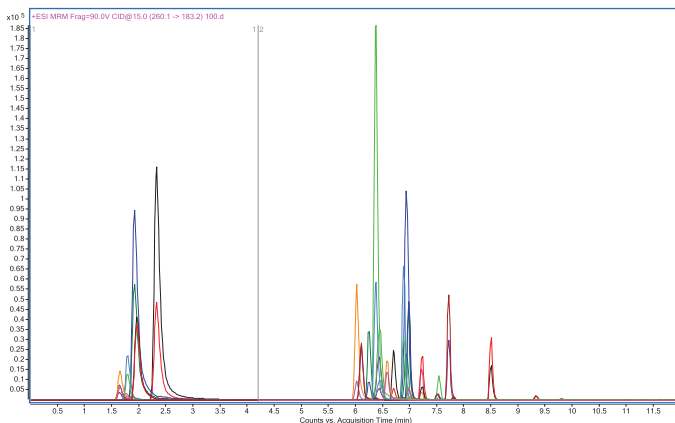
15. táblázat – Az alkalmazott gradiens program



11. ábra – MRM kromatogram az első eluens-kombináció alkalmazásával
(10 mM NH_4 -formiát, pH = 3,0 (HCOOH) @ ACN + 0,1 % HCOOH)



12. ábra – MRM kromatogram a második eluens-kombináció alkalmazásával
(10 mM NH_4 -acetát, pH = 3,5 (CH_3COOH) @ ACN + 0,5 % CH_3COOH)



13. ábra – MRM kromatogram a harmadik eluens-kombináció alkalmazásával
(10 mM NH_4 -acetát, pH = 5,0 (CH_3COOH) @ ACN + 0,15 % CH_3COOH)

A fenti ábrákon is szembevetendő különbség: a formiátos (pH = 3,0) puffer-rendszer használata esetén jelentős csúcskiszélesedés tapasztalható a kromatogram első időszegmensében (ld. 11. ábra), ellentétben a másik kettő, acetátos rendszerrel. Ennek köszönhetően az első kombinációt kizárhattam. A két acetátos rendszer közül azért választottam a pH = 5,0-ra állított puffer-rendszert és a kevésbé savanyított szerves fázist (harmadik eluens-kombináció), mert egyes komponensek esetén intenzívebb jelet detektáltam, mint a második eluens-kombinációval.

7.5 A szilárd-fázisú extrakciós minta-előkészítési módszer kidolgozása

7.5.1 Különböző SPE patronok tesztelése

Minden komponens elfogadható visszanyerésére a legmegfelelőbb extrakciós módszer kiválasztásához összesen 11 különböző fázisú SPE patronot teszteltem. Ezek közül hét szilika-alapú fordított fázisú, illetve kationcserélő volt:

- Agilent SampliQ Si-SCX (500 mg, 6 ml),
- Agilent SampliQ C18 (150 mg, 6 ml),
- Agilent SampliQ C18-EC (150 mg, 6 ml),
- Isolute DSC-SCX (200 mg, 6 ml),
- Isolute DSC-WCX (200 mg, 6 ml),
- Isolute Multimode (300 mg, 3 ml),
- Varian SPEC SCX (35 mg, 10 ml).

Négy pedig polimer alapú, szintén fordított fázisú, illetve kationcserélő:

- Agilent SampliQ Polymer SCX (150 mg, 6 ml),
- Waters Oasis HLB (60 mg, 3 cc. és 500 mg, 12 cc.),
- Isolute ENV+ (200 mg, 6 ml),
- Varian Bond Elut Plexa PCX (500 mg, 6 ml).

Az előkészítési folyamatok kiindulási alapja minden esetben a gyártó által javasolt eljárás volt és a kapott visszanyerések alapján változtattam rajtuk. Az alkalmazott eljárásokat a *Függelékben* (10.2 és 10.3) foglaltam össze.

Az adott SPE patronokon kapott visszanyerési értékeket dolgozatomban táblázatosan nem foglalom össze azonban röviden az alábbi eredményeket kaptam:

Agilent SampliQ Si-SCX töltet alkalmazásával mindössze négy komponens visszanyerése volt 65% feletti, négy komponensé 48-57% közötti, míg további négy komponensé 5-17% közötti. A többi komponensre nem volt visszanyerés.

Agilent SampliQ C18 töltet alkalmazásával mindössze 12 komponens esetén kaptam visszanyerést, de ezek értéke egy kivétellel (pantoprazolra 47%) még a 30%-ot sem érték el.

Habár Agilent SampliQ C18-EC töltet alkalmazásával csak 9 komponensre kaptam visszanyerést, ezek értéke három kivételével (atorvasztatinra 49%, ranitidinre 3%, szimvasztatinra 41%) meghaladják az 50%-ot, sőt akár 80%-ot is elérnek (pl.: metoprololra 71%, pantoprazolra 78%, ramiprilra 84%).

Isolute DSC-SCX töltet alkalmazásával nyolc komponens esetén a visszanyerési értékek meghaladják a 65%-ot. Ezek a komponensek a lovasztatin kivételével β -blokkolók. A többi komponens közül háromra (enalapril, propranolol, ramipril) 50% feletti visszanyerést tapasztaltam, lisinoprilra 38%-ot, míg nimodipinre mindössze 8%-ot.

Isolute DSC-WCX töltet alkalmazásával mindössze öt komponensre kaptam visszanyerést, azonban ezek közül is csak a betaxolol és a ramipril értéke haladta meg a 65%-ot.

Isolute Multimode töltet alkalmazásával a visszanyerhető 13 komponens értéke 50% alatti volt.

Varian SPEC SCX töltet alkalmazásával összesen két komponens volt visszanyerhető: a carvedilol (29%) és a szimvasztatin (58%).

Agilent SampliQ Polymer SCX töltet alkalmazásával mindössze két komponensre (enalapril, ramipril) kaptam 65% feletti visszanyerést, háromra 35-60% közötti, míg további háromra 10-25% közötti értékeket mértem ki.

Waters Oasis HLB töltet alkalmazásakor kiderült, hogy a 60 mg-os töltet mennyiség nem elegendő, ezért volt szükség az 500 mg-os töltet mennyiség kipróbálására is. Ezutóbbi patronon két eljárást is teszteltem, a gyártói ajánlás szerintit, illetve a Vieno és munkatársai [152] által alkalmazott metodikán alapuló eljárást is. Már a gyártói procedura alkalmazásakor is jelentősen jobb eredményeket tapasztaltam, mint a többi patron esetén, azonban a másik procedura alkalmazásával 21 komponensre kaptam visszanyerést, melyek közül 16 értéke meghaladta a 65%-ot.

Isolute ENV+ töltet alkalmazásával 17 komponensre kaptam visszanyerést, amiből csak a szimvasztatin értéke volt 69%, a többi komponens esetén 21% alatti értékeket tapasztaltam.

Varian Bond Elut Plexa PCX töltet alkalmazásával mindössze 11 komponensre kaptam visszanyerést, melyek közül csak hatnak volt 65% feletti értéke.

Az eredmények alapján az Oasis HLB patron bizonyult a legjobbnak, azonban a további optimalizációs lépések során még a két SampliQ kationcserélő patron is teszteltem, melyről a következő pontban (7.5.2) írok részletesebben.

7.5.2 Mátrix-hatás vizsgálat

A végleges előkészítési módszer kiválasztása nem csak a visszanyerési adatok alapján történt, hanem elvégeztem egy mátrix-hatás vizsgálatot is, a bioanalitikai módszerek kidolgozásából ismert, ún. poszt-extrakciós adalékolás módszerével (post-extraction spike method, PESM) [153-154]. A vizsgálat során három különböző minta-sorozatot készítettem el. Az első sorozat mintái 10 % metanol/Millipore vízben elkészített ún. „tisztá” kalibráló oldatok voltak, 25, 50, 100 és 300 ng/ml koncentrációban. A második sorozat mintái 4x500 ml Dunavíz szilárd-fázisú extrakcióját követően, 500 µl kalibráló oldatok visszaoldásával készültek, 25, 50, 100 és 300 ng/ml koncentrációban. Míg a harmadik sorozat mintái 500 µl kalibráló oldatokkal – 25, 50, 100 és 300 ng/ml koncentrációban - adalékolta, 500 ml Dunavíz extrakciójával készültek.

A módszer alkalmazása során a három minta-sorozat lemerését követően a komponensek csúcsterületeit hasonlítottam össze. Bármilyen különbség az első és a második minta-sorozat csúcsterületei között a mátrix-hatásnak köszönhető, míg az eltérés a harmadik minta-sorozat esetén a mátrix-hatás és az eltérő visszanyerés együttes eredménye. Amennyiben a három minta-sorozat lemerésekor kapott csúcsterületeket rendre A, B, C-vel jelöljük, az alábbi képletek segítségével megadható a mátrix-hatás („matrix effect”, ME), a visszanyerés („recovery”, RE) és a módszer hatékonysága („process efficiency”, PE) százalékos értékben kifejezve:

$$ME (\%) = B/A * 100,$$

$$RE (\%) = C/B * 100,$$

$$PE (\%) = C/A * 100 = (ME*RE) / 100.$$

A módszert három különböző SPE patronnal, négy különböző eljárás segítségével végeztem el, amelyeket a 16. táblázatban foglaltam össze.

SPE patron	SampliQ Polymer SCX (150 mg, 6 ml)	SampliQ Si-SCX (500 mg, 6 ml)	Oasis HLB (500 mg, 12 cc.)	Oasis HLB (500 mg, 12 cc.)
Extrakciós módszer	I	II	III	IV
Minta pH*	10,0	10,0	-	10,0
Kondicionálás	5ml MeOH	5ml MeOH	5ml MeOH	5ml n-hexán 5ml aceton 10ml MeOH
Ekvilibrálás	5ml MQ víz ^a , pH = 10,0	5ml MQ víz, pH = 10,0	5ml MQ víz	5ml MQ víz, pH = 10,0
Mintafelvitel	~3-4 ml/perc	~3-4 ml/perc	~3-4 ml/perc	~3-4 ml/perc
Mosás	5ml MQ víz, pH = 10,0	5ml MQ víz, pH = 10,0	5ml MQ víz	5ml 5%MeOH/2%NH ₃ - old. ^b
Száritás	10 perc	10 perc	10 perc	10 perc
Elúció	2,5ml MeOH + 2,5ml MeOH/NH ₃ -old. 1:1 elegye	2,5ml MeOH + 2,5ml MeOH/NH ₃ -old. 1:1 elegye	2x2,5ml MeOH	2x2,5ml MeOH
Bepárlás	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)
Visszaoldás	500μl 10% MeOH/MQ víz	500μl 10% MeOH/MQ víz	500μl 10% MeOH/MQ víz	500μl 10% MeOH/MQ víz

*A harmadik extrakciós módszer esetén a minta pH-ját nem állítottam, míg a többi esetben 25%-os ammónia-oldattal állítottam 10,0-ra.

a: „MQ víz” – ioncserélt víz

b: „NH₃-old.” – 25%-os ammónia-oldat

16. táblázat – Mátrix-hatás vizsgálatok alkalmazott SPE patronok és eljárások

A mátrix-hatás vizsgálat során kapott százalékos eredményeket, komponensekre lebontva a 17. táblázatban foglaltam össze. Az adatok alapján megállapítható, hogy a negyedik extrakciós módszert alkalmazva mindössze hat olyan komponens van, amelyre a módszer hatékonysága (PE (%)) kisebb, mint 60 %, ellentétben a másik három módszerrel, ahol több komponensre sem elfogadható ez az érték. A fent említett hat komponens közül a lisinopril eredménye tekinthető teljességgel elfogadhatatlannak (3 %), ezért ez a komponens a validálásból is kimaradt. Illetve további két komponens (cimetidin, szimvasztatin) esetén kisebb a módszer hatékonysága 40 %-nál. Az atenolol kivételével minden komponens esetén a nem megfelelő visszanyerés értékből (RE (%)) fakad a módszer kisebb hatékonysága. Ezzel szemben atenolol esetén a magas visszanyerés érték ellenére a jelentős ionsuppressziónak köszönhető a kisebb hatékonyság. Ugyanakkor egyes komponensek (amlodipin, carvedilol és nimodipin) esetén a mátrix-hatás pozitív eredményű. Azaz a mátrix erősíti az ionizációt, tehát jelenlétében gyakorlatilag több ion keletkezik.

Mindezeken túl egy „negatív diszkrimináció” is megfigyelhető az első extrakciós módszer esetén, cimetidin, famotidin, nizatidin és ranitidin komponensekre nézve, összehasonlítva a többi módszerrel.

Mindezek alapján a negyedik extrakciós módszert választottam ki a felszíni vízminták előkészítésére.

Komponensek	Extrakciós módszerek											
	I.			II.			III.			IV.		
	ME (%)	RE (%)	PE (%)	ME (%)	RE (%)	PE (%)	ME (%)	RE (%)	PE (%)	ME (%)	RE (%)	PE (%)
Acebutolol	113	94	106	106	99	105	112	102	115	106	94	100
Amlodipin	118	49	58	105	111	117	59	49	28	145	50	72
Atenolol	171	90	153	108	100	108	96	45	43	43	99	43
Atorvasztatin	101	96	97	99	8	8	97	51	49	105	73	77
Betaxolol	109	48	53	135	104	140	108	102	110	115	91	105
Carvedilol	106	27	29	116	73	85	120	135	163	148	47	69
Cimetidin	127	3	4	98	52	51	8	5	0	75	48	36
Enalapril	114	59	68	96	2	2	115	100	115	110	99	109
Esmolol	105	68	71	111	98	109	107	97	104	107	90	97
Famotidin	114	7	8	88	30	27	3	15	0	77	53	41
Fluvasztatin	99	95	94	96	9	9	61	2	1	107	71	76
Lansoprazol	117	129	150	107	35	38	62	66	41	112	89	100
Lisinopril	94	11	11	113	1	2	97	25	24	118	3	3
Lovasztatin	118	87	105	102	7	16	75	69	51	84	77	65
Metoprolol	104	80	83	114	102	117	101	101	101	104	94	98
Nifedipin	104	93	97	105	85	89	87	7	6	106	77	81
Nimodipin	110	95	104	100	112	112	85	5	4	128	84	107
Nizatidin	109	19	20	90	54	49	33	1	0	84	78	66
Omeprazol	118	111	131	107	59	63	70	65	46	111	88	97
Oxprenolol	107	81	87	117	102	119	100	101	101	106	92	97
Pantoprazol	111	93	103	102	15	16	93	89	82	108	92	99
Propranolol	105	23	24	157	104	162	100	113	113	103	95	98
Ramipril	111	81	89	96	3	3	109	93	102	111	93	103
Ranitidin	106	20	21	140	18	25	29	1	0	89	64	57
Szimvasztatin	107	30	30	101	3	11	70	55	38	78	36	28
Sotalol	104	95	98	101	98	98	132	72	94	87	81	70

*A mátrix-hatás (ME (%)) esetén a 100-nál kisebb érték jelenti az ionszuppressziót, míg a 100-nál nagyobb érték az ionizáció erősítését.

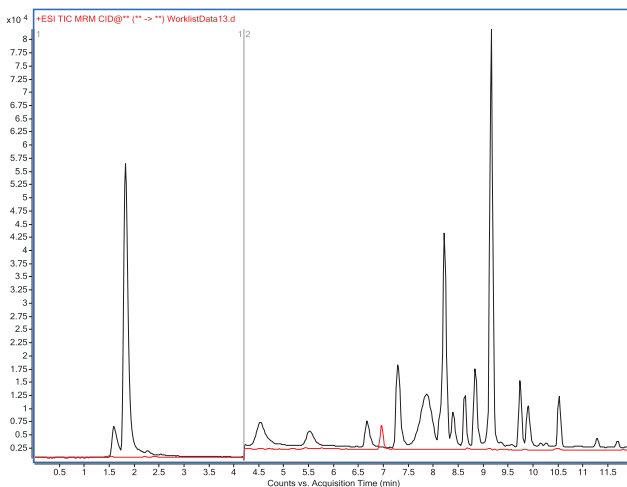
17. táblázat – A poszt-extrakciós adalékolás módszerével elvégzett mátrix-hatás vizsgálat eredményei

7.6 A módszer validálása

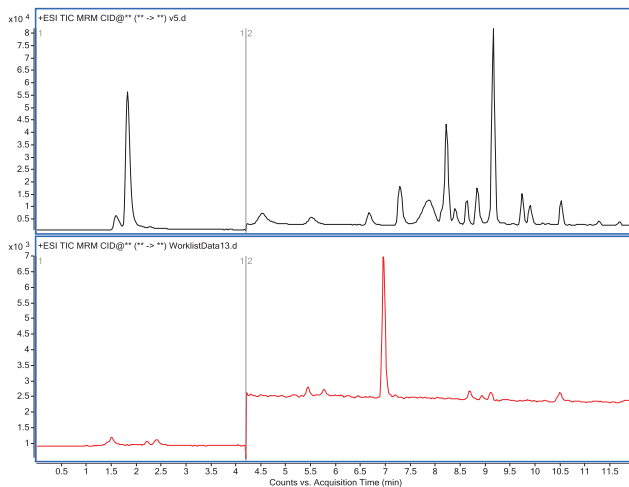
A módszer validálásának célja a 18 szívgyógyszer és 7 gyomorsav-túltengést gátló szer meghatározására kidolgozott SPE-LC-ESI-MS/MS módszer teljesítményjellemzőinek meghatározása és a módszer alkalmasságának vizsgálata volt. A poszt-extrakciós adalékolás módszerével elvégzett vizsgálat eredménye (rendkívül rossz visszanyerés és módszer hatékonyság) alapján a lisinopril-re nem validáltam a módszert.

7.6.1 Specifitás / Szelektivitás

A módszer szelektivitása arra vonatkozik, hogy a módszer alkalmas-e a mérendő komponensek meghatározására egyéb zavaró alkotók jelenlétében. Mértékének megállapítására a vak, csapvíz minta és az 5 ng/ml-es, legkisebb koncentrációjú, mátrixsal terhelt kalibráló oldat kromatogramjait hasolítottam össze (14-15. ábra).



14. ábra –Vak minta és a legkiseb koncentrációjú mátrixsal terhelt kalibráló oldat TIC kromatogramja egymásra fektetve



15. ábra - A legkiseb koncentrációjú mátrixsal terhelt kalibráló oldat és a vak minta TIC kromatogramjai

A kromatogramokon jól látható a nagyságrendbeli különbség a kb. 7 percnél megjelenő zavaró csúcs és a mérendő komponensek között. Továbbá ez a csúcs a kiértékelést nem befolyásolja, ugyanis a retenciós ideje nem felel meg egyetlen célkomponensnek sem, illetve nem tartozik hozzá második MRM átmenet.

7.6.2 Linearitás

A linearitás a módszer azon jellemzője, amely alkalmassá teszi egy adott koncentráció-tartományon belül a koncentráció és a detektor válaszjel közötti összefüggés megállapítását. A linearitást a mátrixsal terhelt kalibrációs oldatokkal határoztam meg 5 – 300 ng/ml koncentráció-tartományban. Az értékelést követően a legkisebb négyzetek módszerével meghatároztam a regressziós egyenes egyenletét és a regressziós koeficiens értékét. A regressziós koeficiens értékeket a 18. táblázatban foglaltam össze.

Az eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált tartományban a kalibrációs görbe az összes komponensre lineáris, a kapott regressziós koeficiens minden esetben nagyobb, mint 0,98, illetve két komponens kivételével (nizatidin és ranitidin) nagyobb, mint 0,99.

7.6.3 Precizitás

A precizitás a véletlen hiba mérőszáma. A módszer precizitása a kölcsönösen független megismételt vizsgálatok eredményei közötti egyezés mértéke a becült tapasztalati szórással (standard deviáció, SD), vagy a százalékos szórással (relatív standard deviáció, RSD) kifejezve.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} \qquad RSD\% = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

A napon belüli precizitás meghatározásához három párhuzamos csapvíz mintát adalékoltam 10, 50 és 300 ng/l-es koncentrációban, és ezeket előkészítve - a IV-es extrakciós módszer szerint – számítottam RSD%-ot. A napok közötti precizitás meghatározásához a fenti vizsgálatot három különböző napon megismételtem és számítottam rá RSD%-ot. Az eredményeket a 19. táblázatban foglaltam össze.

A napon belüli precizitás eredmények három komponenst leszámítva (esmolol, lovasztatin és szimvasztatin) 10% alattinak adódtak, míg a napok közötti precizitás eredmények három komponenst leszámítva (carvedilol, esmolol és szimvasztatin) 20% alattiak voltak. Összességében ezek az eredmények igen jónak tekinthetők, ilyen kis mennyiségek mérésénél.

7.6.4 Torzítatlanság

A torzítatlanság a rendszeres hiba kimutatására szolgál. A hiba azon eleme, ami ugyanazon alkotók ismételt mérése során állandó marad, vagy kiszámítható módon változik. Megállapításához 10, 50 és 300 ng/l koncentrációban adalékolt csapvíz minták előkészítését követően meghatároztam a kapott és a várt eredmények százalékos arányát, ami a 18. táblázatban található.

Az eredmények két komponenstől eltekintve (ranitidin és szimvasztatin) 70 – 120% közöttiek. Összességében hat olyan komponens van, amire a torzítatlanság 80% alatti: amlodipin, esmolol, famotidin, lovasztatin, ranitidin és szimvasztatin.

7.6.5 Kimutatási határ

Egy komponens kimutatási határa (LOD) az a koncentráció, amelyhez tartozó jel megegyezik a vakminta válaszelőjelének és a vakminta válaszelőjéhez tartozó tapasztalati szórás háromszorosának összegével. A gyakorlatban ez azt a legkisebb koncentrációt jelenti, ahol a komponens még megbízhatóan detektálható.

Ennek meghatározására adalékolt vízmintákat mértem és addig hígítottam, amíg elértem azt a koncentrációt, amelyre a jel/zaj értéke 3 ($S/N = 3$). Az eredmények a 18. táblázatban találhatók. Összességében a komponensek LOD értéke: 0,2 – 5 ng/l.

7.6.6 A mennyiségi meghatározás határa

Egy komponens meghatározási határa (LOQ) az a legkisebb koncentráció, amely még elfogadható pontossággal és precizitással határozható meg. Értékét a vakminta válaszelőjéhez tartozó tapasztalati szórás tízszeresével számoltam.

Ennek meghatározására adalékolt vízmintákat mértem és addig hígítottam, amíg elértem azt a koncentrációt, amelyre a jel/zaj értéke 10 ($S/N = 10$). Az eredmények a 18. táblázatban találhatók. Összességében a komponensek LOQ értéke: 1 – 15 ng/l.

7.6.7 Stabilitás

A törzsoldatok stabilitását három havonta ellenőriztem, és megállapítottam, hogy hat hónapig, mélyhűtőben biztonsággal eltarthatók.

A minták stabilitásának vizsgálatát két párhuzamos, szűrt, 50 ng/l-re adalékolt Dunavíz minták mérésével végeztem el. A mintákat hűtőben tároltam, alufóliába csomagolt üvegedényekben és naponta készítettem elő belőlük. Megállapítottam, hogy egy hét elteltével a komponensek nagyrésze elbomlott a hűtőben tárolás során. Azonban a minták két napig, fénnytől védve, + 4 °C-on jelentősebb koncentráció-változás nélkül eltarthatók.

Komponensek	Lineáritás (R ²)	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)	Torzítatlanság (%)		
				10 ng/l	50 ng/l	300 ng/l
Acebutolol	0,9971	0,2	1	88	111	98
Amlodipin	0,9998	5	10	71	92	97
Atenolol	0,9997	0,2	1	91	105	98
Atorvasztatin	0,9992	4	5	90	103	99
Betaxolol	0,9979	1	2	88	103	100
Carvedilol	0,9985	5	10	103	108	99
Cimetidin	0,9924	0,2	1	88	112	97
Enalapril	0,9999	0,2	1	108	103	100
Esmolol	0,9974	5	10	77	104	99
Famotidin	0,9949	1	2	76	105	99
Fluvasztatin	0,9979	1	2	89	108	100
Lansoprazol	0,9996	4	10	93	109	98
Lisinopril	0,9985	-	-	-	-	-
Lovasztatin	0,9996	3	10	79	83	93
Metoprolol	0,9966	0,2	1	89	103	100
Nifedipin	0,9989	5	15	86	91	97
Nimodipin	0,9991	5	10	87	94	98
Nizatidin	0,9824	1	2	86	104	98
Omeprazol	0,9993	1	2	91	99	98
Oxprenolol	0,9978	3	8	85	94	97
Pantoprazol	0,9952	2	4	93	98	98
Propranolol	0,9975	1	2	95	99	100
Ramipril	0,9997	0,5	2	94	98	103
Ranitidin	0,9841	0,5	2	69	76	96
Szimvasztatin	0,9989	3	10	66	71	79
Sotalol	0,9985	0,2	1	86	88	92

18. táblázat – A módszer validálásának eredményei

Komponensek	Precizitás (RSD%)					
	Napon belüli			Napok közötti		
	10 ng/l	50 ng/l	300 ng/l	10 ng/l	50 ng/l	300 ng/l
Acebutolol	0,7	4,6	2,1	7,8	8,9	9,4
Amlodipin	0,2	0,9	1,1	10,2	11,3	10,9
Atenolol	1,4	0,7	4,6	1,8	1,7	5,8
Atorvasztatin	2,2	4,1	8,2	9,5	13,2	15,3
Betaxolol	1,4	2,9	3,1	5,9	9,5	3,5
Carvedilol	2,3	4,9	5,8	14,0	22,3	18,9
Cimetidin	0,2	1,1	0,4	7,0	8,2	9,7
Enalapril	3,6	0,6	0,4	6,9	4,4	1,2
Esmolol	4,9	9,1	12,1	22,3	16,3	21,3
Famotidin	3,9	5,7	6,7	15,0	5,0	11,8
Fluvasztatin	5,7	9,0	4,6	9,8	13,0	11,1
Lansoprazol	2,3	2,6	0,6	6,9	3,0	2,0
Lovasztatin	10,2	4,7	6,4	11,8	8,8	8,4
Metoprolol	4,5	0,8	5,3	13,2	11,1	10,3
Nifedipin	1,6	4,6	5,8	10,2	9,7	8,8
Nimodipin	4,3	2,6	3,2	9,1	8,5	8,0
Nizatidin	5,8	4,5	4,3	15,3	13,4	12,5
Omeprazol	2,2	1,7	0,9	5,1	6,5	4,9
Oxprenolol	4,8	4,5	2,3	9,4	8,1	7,5
Pantoprazol	5,7	1,4	2,0	7,8	6,5	5,9
Propranolol	2,8	1,2	0,8	10,2	15,1	9,9
Ramipril	1,2	0,4	0,4	5,9	1,9	2,2
Ranitidin	5,7	4,3	3,9	11,3	9,6	6,6
Szimvasztatin	14,6	10,7	9,8	22,4	19,9	21,0
Sotalol	3,4	2,7	3,1	13,2	11,1	8,4

19. táblázat – A precizitás-vizsgálat eredményei

7.7 A kidolgozott módszer alkalmazása Dunavíz mintákra

A kidolgozott módszer alkalmasságának további ellenőrzéséhez a mintákat Dél-Budapesten (1644 folyam- km) gyűjtöttem, hét alkalommal, két téli hónapon keresztül. Minden alkalommal 500 ml vízmintát vettem, sötét üvegben és még aznap feldolgoztam őket. Első lépésként 500 µl belső standard oldatot adtam a mintákhoz, ami mind a négy belső standardet 50 ng/ml koncentrációban tartalmazta. Ezt követően leszűrtem a mintákat szűrőpapíron keresztül, majd 25%-os ammónia-oldat segítségével beállítottam a pH-jukat 10,0-ra. A szilárd-fázisú extrakciós mintaelőkészítést a fentebb részletezett (16. táblázat) IV-es extrakciós módszer szerint végeztem el Oasis HLB (500 mg, 12 cc.) SPE patronnal.

A mennyiségi meghatározást ún. „matrix-matched” és belső standard kalibráció kombinációjával végeztem el. A mátrixkalibrációhoz 8x100 ml Dunavíz mintát készítettem elő Oasis HLB (60 mg, 3 cc.) SPE patronon, a IV-es extrakciós módszer szerint. Ebben az esetben nem adtam belső standard oldatot a mintákhoz a szűrést megelőzően, illetve a bepárolt eluátumok visszaoldását 1 ml „tisztá” kalibráló oldatokkal végeztem el 5, 10, 25, 50, 75, 100 és 300 ng/ml koncentrációban, amelyekben a belső standardek koncentrációja 50 ng/ml volt. A nyolcadik mintát – amelyre az esetleges korrekciók elvégzése miatt volt szükségem - 1 ml 10% MeOH/Millipore vízben oldottam vissza.

A komponensek azonosítását a két MRM átmenettel, azok arányával és a retenciósidők segítségével végeztem el. A kalibrációt a legkisebb négyzetek módszerével készítettem el, amelyhez az intenzívebb MRM átmenetet használtam fel, minden komponens esetén. Az eredményeket a 20. táblázatban foglaltam össze. A táblázatban csak azokat a komponenseket tüntettem fel, amelyeket detektáltam a mintákból.

Terápiás csoport	Komponensek	Mért koncentrációk (ng/l)		
		Átlag	Minimum	Maximum
β-blokkolók	Acebutolol	2	1	3
	Atenolol	14	11	19
	Metoprolol	29	18	55
	Sotalol	22	9	36
H ₂ -receptor antagonisták	Cimetidin	34	17	46
	Famotidin	19	5	34
	Nizatidin	29	29	29
	Ranitidin	39	9	60
ACE-inhibitorok	Enalapril	3	2	4
	Ramipril	3	2	5
Proton pumpa inhibitorok	Lansoprazol	<LOQ*	<LOQ	<LOQ
	Pantoprazol	6	4	7

*<LOQ: csak detektálható, de nem éri el a meghatározási határt.

20. táblázat –Dunavíz mintákban mért koncentrációk

7.8 Gyógyszermetabolitok kimutatása felszíni vízből

Munkám ezen része három részre tagolódott. Először az irodalomban néztem utána az általam vizsgált hatóanyagok ismert metabolitjainak (ld. 5.8 fejezet). Ezt követően felépítettem egy predikciós módszert az ismert biotranszformációs reakciók okozta tömegváltozások felhasználásával, amit hármass kvadрупól analizátorú (QqQ) MS-el, ún. prediktív MRM módszerrel teszteltem. Végül a predikciós módszerrel kimutatott metabolitokat repülési idő analizátorú (TOF) MS segítségével mért pontos tömegek alapján igazoltam a felszíni vízmintákban.

7.8.1 A prediktív MRM módszer felépítése és tesztelése

Vizsgálataim során egy olyan prediktív MRM módszert alkalmaztam, amire eddig nem találtam példát az irodalomban. A módszer felépítéséhez az anyavegyület MRM paramétereiből (ld. 13. táblázat) és az irodalomban talált metabolitokból indultam ki. A kezdeti módszer kidolgozásakor minden egyes komponensnek meghatároztam a két legintenzívebb fragmentationját és az ehhez tartozó ütközési energia értékeket:

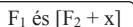


azonos retenciós időnél,

ahol M^+ a protonált molekulaion (precursor) és F_1 , illetve F_2 a két fragmentum. Ismerve a biotranszformációs reakció során a molekulában bekövetkező szerkezeti változást – például hidroxiláció során egy H-atom lecserélődik egy hidroxil-csoportra (+16 Da tömegváltozás) – kiszámítható minden egyes reakció során a komponens tömegváltozása, amit a következőkben „x”-el jelöltem. Miután az anyavegyület tömege x-el megváltozik a fragmentáció során is látszódnia kell ennek a változásnak. Feltételezve, hogy a metabolit fragmentációja nagymértékben hasonlít az anyavegyületére, a tömegváltozásnak valamelyik fragmentum tömegében meg kell jelennie, miközben a másik fragmentum tömege változatlan:



vagy



azonos retenciós időnél.

Ezzel a módszerrel minden egyes komponensre négy, illetve a kétszeresen átalakulókra (pl. ilyen a lansoprazol hidroxilált-szulfon metabolitja) hat MRM átmenet építhető fel, melyek követésével lehetőség van a metabolitok azonosítására víz mintákból.

A módszer teszteléséhez ötször egy liter Dunavíz mintát készítettem elő Oasis HLB (500 mg, 12 cc.) SPE patronokon a IV-es (ld. 16. táblázat) extrakciós módszer szerint. Az

eluátumokat egy azonos fiolába gyűjtöttem, majd a bepárlását követően 500 µl 10% MeOH/Millipore vízben oldottam vissza, amivel tízezerszeres dúsítást értem el. A minta vizsgálatát a validált módszernek megfelelően Agilent 1200 LC-n és Agilent 6460 QqQ készüléken végeztem. Az elválasztást Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (2,1x100 mm, 1,8 µm) oszlopon végeztem, 50 °C-on 250 µl/min áramlási sebességgel; 10 mM NH₄-acetát, pH = 5,0 (CH₃COOH-al) [„A”] és ACN + 0,15 % CH₃COOH [„B”] eluens-kombináció mellett az alábbi gradiens szerint:

Idő (perc)	% B eluens
0	10
4	80
8	100
15	100

21. táblázat – Metabolit azonosításhoz alkalmazott gradiens program

A metabolit-vizsgálat során alkalmazott gradiens program eltért a validált módszerben leírttól. A végső eluens összetételt (100 % B eluens) 3 perccel tovább tartottam, annak érdekében, hogy biztosan eluálódjon minden keresett komponens az oszlopról. Illetve ezzel próbáltam elkerülni a nagymértékű dúsítás során betöményített mátrix-komponensek felragadását az oszlopra.

A mintából 5 µl-t injektáltam és minden hatóanyagra külön módszert dolgoztam ki a specifikus átmenetek követéséhez. Az ionforrás paraméterek a következők voltak:

Köpeny gáz hőmérséklete	200 °C
Köpeny gáz áramlási sebessége	4 l/min
Száritógáz (N ₂) hőmérséklete	350 °C
Száritógáz (N ₂) áramlási sebessége	10 l/min
Porlasztógáz (N ₂) nyomása	35 psi
Kapilláris feszültség	3500 V
Nozzle feszültség	500 V

22. táblázat – Az ionforrás működési paraméterei a prediktív MRM módszerek alkalmazásánál

A fragmentor feszültség és az ütközési energia értékek megegyeztek az anyavegyületre megállapított értékekkel (ld. 13. táblázat). Egyes metabolitokat előre megírt közös MRM-táblákkal kerestem, melyeket a következő táblázatokban foglaltam össze (23-26. táblázat), míg másokat egyedileg. Ezutóbbiakat külön nem részletezem.

Komponensek	FragV	MRM átmenet	CE (V)	Dwell time (ms)
Amlodipin	100	409,1 > 294,1	10	30
Amlodipin	100	409,1 > 238	10	30
Amlo_metab_I	100	425,1 > 296	10	30
Amlo_metab_I	100	425,1 > 294,1	10	30
Amlo_metab_I	100	425,1 > 238	10	30
Amlo_metab_I	100	425,1 > 224	10	30
Amlo_metab_II	100	423,1 > 294,1	10	30
Amlo_metab_II	100	423,1 > 293,1	10	30
Amlo_metab_II	100	423,1 > 238	10	30
Amlo_metab_III	100	409,1 > 279	10	30
Amlo_metab_III	100	409,1 > 224	10	30
Amlo_metab_IV	100	408,1 > 293,1	10	30
Amlo_metab_IV	100	408,1 > 238	10	30
Amlo_metab_V	100	394,1 > 280,1	10	30
Amlo_metab_V	100	394,1 > 224	10	30
Amlo_metab_VI	100	380,1 > 309	10	30
Amlo_metab_VI	100	380,1 > 294,1	10	30
Amlo_metab_VI	100	380,1 > 253	10	30
Amlo_metab_VI	100	380,1 > 238	10	30
Amlo_metab_VII	100	365,1 > 294,1	10	30
Amlo_metab_VII	100	365,1 > 294	10	30
Amlo_metab_VII	100	365,1 > 239	10	30
Amlo_metab_VII	100	365,1 > 238	10	30
Amlo_metab_VIII	100	364,1 > 294,1	10	30
Amlo_metab_VIII	100	364,1 > 238	10	30
Amlo_metab_VIII	100	364,1 > 234	10	30
Amlo_metab_VIII	100	364,1 > 179	10	30
Amlo_metab_IX	100	337,1 > 294,1	10	30
Amlo_metab_IX	100	337,1 > 238	10	30
Amlo_metab_IX	100	337,1 > 210,6	10	30

* FragV – Fragmentor feszültség (V); CE (V) – Ütközési energia (V)

23. táblázat – Amlodipin metabolitokra írt MRM táblázat

Komponensek	FragV	MRM átmenet	CE (V)	Dwell time (ms)
Szimvasztatin-karboxil	80	449,3 > 315,2	5	25
Szimvasztatin-karboxil	80	449,3 > 285,2	5	25
Szimvasztatin-karboxil	80	449,3 > 229,2	5	25
Szimvasztatin-karboxil	80	449,3 > 199,2	5	25
Szimvasztatin-OH	80	435,3 > 301,2	5	25
Szimvasztatin-OH	80	435,3 > 285,2	5	25
Szimvasztatin-OH	80	435,3 > 199,2	5	25
Szimvasztatin-OH	80	435,3 > 135,2	5	25
Lovasztatin-OH	50	421,3 > 301,1	5	25
Lovasztatin-OH	50	421,3 > 285,1	5	25
Lovasztatin-OH	50	421,3 > 199,1	10	25
Lovasztatin-OH	50	421,3 > 135,1	10	25
Szimvasztatin	80	419,3 > 285,2	5	25
Szimvasztatin	80	419,3 > 199,2	5	25
Fluvasztatin	130	412,2 > 266,1	15	25
Fluvasztatin	130	412,2 > 224	30	25
Lovasztatin	50	405,3 > 199,1	10	25
Lovasztatin	50	405,3 > 285,1	5	25
Lovasztatin-exometilén	50	403,3 > 285,1	5	25
Lovasztatin-exometilén	50	403,3 > 283,1	5	25
Lovasztatin-exometilén	50	403,3 > 199,1	10	25
Lovasztatin-exometilén	50	403,3 > 197,1	10	25
Dezizopropil-fluvasztatin	130	370,2 > 266,1	15	25
Dezizopropil-fluvasztatin	130	370,2 > 224	30	25
Dezizopropil-fluvasztatin	130	370,2 > 182	30	25
Nifedipin	70	347,1 > 315,1	0	25
Nifedipin	70	347,1 > 254,1	15	25
Dehidronifedipin	70	345 > 284,1	15	25
Acebutolol	70	337,1 > 218	25	25
Acebutolol	70	337,1 > 116	25	25
Diacetolol	70	309,1 > 218	25	25
Diacetolol	70	309,1 > 190	25	25
Diacetolol	70	309,1 > 116	25	25
Diacetolol	70	309,1 > 88	25	25

* FragV – Fragmentor feszültség (V); CE (V) – Ütközési energia (V)

24. táblázat – Sztatinok, nifedipin és acebutolol metabolitokra írt MRM táblázat

Komponens	FragV	MRM átmenet	CE (V)	Dwell time (ms)
Atorvasztatin-2OH	120	591,4 > 498,2	15	20
Atorvasztatin-2OH	120	591,4 > 482,2	15	20
Atorvasztatin-2OH	120	591,4 > 472,3	20	20
Atorvasztatin-2OH	120	591,4 > 466,2	15	20
Atorvasztatin-2OH	120	591,4 > 456,3	20	20
Atorvasztatin-2OH	120	591,4 > 440,3	20	20
Atorvasztatin-OH	120	575,4 > 466,2	15	20
Atorvasztatin-OH	120	575,4 > 440,3	20	20
Atorvasztatin	120	559,4 > 466,2	15	20
Atorvasztatin	120	559,4 > 440,3	20	20
Szimvasztatin-sav	80	435,3 > 301,2	5	20
Szimvasztatin-sav	80	435,3 > 285,2	5	20
Szimvasztatin-sav	80	435,3 > 215,2	5	20
Szimvasztatin-sav	80	435,3 > 199,2	5	20
Szimvasztatin	80	419,3 > 285,2	5	20
Szimvasztatin	80	419,3 > 199,2	5	20
Fluvasztatin-OH	130	428,2 > 282,1	15	20
Fluvasztatin-OH	130	428,2 > 240	30	20
Fluvasztatin	130	412,2 > 266,1	15	20
Fluvasztatin	130	412,2 > 224	30	20
Carvedilol-OH	150	423,1 > 283	20	20
Carvedilol-OH	150	423,1 > 240,1	25	20
Carvedilol	150	407,1 > 283	20	20
Carvedilol	150	407,1 > 240,1	25	20
Ramiprilát	120	389,3 > 206,2	20	20
Ramiprilát	120	389,3 > 102,1	30	20
Ramipril	120	417,3 > 234,2	20	20
Ramipril	120	417,3 > 130,1	30	20
Enalaprilát	140	349,2 > 303,2	15	20
Enalaprilát	140	349,2 > 206,2	15	20
Enalapril	140	377,2 > 303,2	15	20
Enalapril	140	377,2 > 234,2	15	20
Esmolol-sav	100	282,1 > 240,1	15	20
Esmolol-sav	100	282,1 > 222,1	15	20
Esmolol-sav	100	282,1 > 205	15	20
Esmolol	100	296,1 > 254,1	15	20
Esmolol	100	296,1 > 219	15	20
Propranolol-OH	90	276,1 > 199,2	15	20
Propranolol-OH	90	276,1 > 116,2	15	20
Propranolol	90	260,1 > 183,2	15	20
Propranolol	90	260,1 > 116,2	15	20

* FragV – Fragmentor feszültség (V); CE (V) – Ütközési energia (V)

25. táblázat – Több komponens metabolitjaira írt MRM táblázat

Komponensek	FragV	MRM átmenet	CE (V)	Dwell time (ms)
Lansoprazol-OH-szulfon	80	402,1 > 268,1	10	50
Lansoprazol-OH-szulfon	80	402,1 > 135,1	15	50
Lansoprazol-szulfon	80	386,1 > 268,1	10	50
Lansoprazol-szulfon	80	386,1 > 119,1	15	50
Lansoprazol-OH-szulfonil	80	386,1 > 252,1	10	50
Lansoprazol-OH-szulfonil	80	386,1 > 135,1	15	50
Lansoprazol	80	370,1 > 252,1	10	50
Lansoprazol	80	370,1 > 119,1	15	50
Lansoprazol-OH-szulfid	80	370,1 > 236,1	10	50
Lansoprazol-OH-szulfid	80	370,1 > 135,1	15	50
Lansoprazol-szulfid	80	354,1 > 236,1	10	50
Lansoprazol-szulfid	80	354,1 > 119,1	15	50

* FragV – Fragmentor feszültség (V); CE (V) – Ütközési energia (V)

27. táblázat – Lansoprazol metabolitokra írt MRM táblázat

A végső összefoglaló táblázatba (27. táblázat) azokat a metabolitokat írtam bele, amelyeket sikerült kimutatnom az előkészített Dunavíz mintából. Az összefoglaló táblázat tartalmazza az egyes metabolitok aktivitását is, amennyiben ismert. Továbbá a vizsgált átmenetek közül vastagított betűvel szedtem azt a két párhuzamos átmenetet, amelyeket a táblázatban megadott retenciós időnél sikerült azonosítanom. A táblázat első hat sorában található az a komponensek, amelyek megerősíthetőek voltak LC-TOF-MS készülékkel is. Ennek a hat metabolitnak az MRM kromatogramját mutatom be a 16. – 21. ábrákon, az összefoglaló táblázatot követően.

Anyavegyület	Metabolit [Hivatkozás]	Aktivitás ^d	Δm	Precursor	FragV	Frag1 (CE)	Frag2 (CE)	Frag3 (CE)	Frag4 (CE)	Frag5 (CE)	Frag6 (CE)	R _t
Atenolol	Hidroxil- [122, 127]	10%	+16 Da	283	100	178 (20)	162 (20)	123 (40)	107 (40)	-	-	7,65
Betaxolol	Savszármazék [117]	? ^a	-31 Da	277,1	70	116,1 (20)	85,1 (20)	161 (20)	130 (20)	-	-	7,34
Lovaszatatin	6'-/3"-Hidroxil- [112]	60%/15%	+16 Da	421,3	50	199,1 (10)	215,1 (10)	285,1 (5)	301,1 (5)	-	-	6,62
Metoprolol	α-Hidroxil- [115, 127]	?	+16 Da	284,2	140	116,1 (15)	132,1 (15)	74,1 (20)	90,1 (20)	-	-	8,93
Oxprenolol	Dezizopropil- [125, 128]	?	-42 Da	224,1	110	72,2 (15)	30,2 (15)	116,2 (15)	74,2 (15)	-	-	9,04
Szimvasztatin	6'-Karboxil- [112]	27%	+30 Da	449	100	155 (10)	125 (10)	203 (10)	173 (10)	-	-	7,09
Acebutolol	Diacetolol [123]	aktív	-28 Da	309,1	70	88 (25)	116 (25)	218 (25)	190 (25)	-	-	3,99
Atorvasztatin	Dihidroxil- ^c	?	+32 Da	591,4	120	440,3 (20)	456,3 (20)	472,3 (20)	466,2 (15)	482,2 (15)	498,2 (15)	6,81
Betaxolol	Hidroxil- [117]	?	+16 Da	324,1	70	116,1 (20)	132,1 (20)	161 (20)	177 (20)	-	-	7,85
Carvedilol	Dezmetil- [113, 114]	aktív	-14 Da	393	150	224 (25)	210 (25)	283 (20)	269 (20)	-	-	9,22
	Hidroxil- [113, 114]	1300%	+16 Da	423	150	224 (25)	240 (25)	283 (20)	299 (20)	-	-	6,95
Cimetidin	Hidroximetil-/ Szulfoxid- ^b	?	+16 Da	269,1	90	95 (30)	111 (30)	159 (10)	175 (10)	-	-	5,82
	Amid- [118, 123]	?	+18 Da	271,1	90	95 (30)	113 (30)	159 (10)	177 (10)	-	-	10,45
Enalapril	Enalaprilát [116]	100%	-28 Da	349,2	140	234,2 (15)	206,2 (15)	303,2 (15)	275,2 (15)	-	-	7,95

Anyavegyület	Metabolit [Hivatkozás]	Aktivitás ^d	Δm	Precursor	FragV	Frag1 (CE)	Frag2 (CE)	Frag3 (CE)	Frag4 (CE)	Frag5 (CE)	Frag6 (CE)	R _t
Fluvasztatin	5-/6-Hidroxil- [112]	88%/45%	+16 Da	428,2	130	224 (30)	240 (30)	266,1 (15)	282,1 (15)	-	-	2,47
	Dezizopropil- propionsav - [112]	inaktív	-74 Da	336,2	130	224 (30)	150 (30)	266,1 (15)	192,1 (15)	-	-	2,26
Lansoprazol	Hidroxil-szulfon- [119, 121]	?	+32 Da	402,1	80	252,1 (10)	284,1 (10)	268,1 (10)	119,1 (15)	151,1 (15)	135,1 (15)	5,84
Lovasztatin	Exometilén- [112]	50%	-2 Da	403,3	50	199,1 (10)	197,1 (10)	285,1 (5)	283,1 (5)	-	-	5,84
Omeprazol	Hidroxisulfon- [121]	?	+32 Da	378,1	100	198 (10)	230 (10)	136,1 (30)	168,1 (30)	-	-	7,91
Oxprenolol	Dezallil- [125, 128]	?	-40 Da	226,1	110	72,2 (15)	32,2 (15)	116,2 (15)	76,2 (15)	-	-	6,99
Pantoprazol	Szulfid- [121]	?	-16 Da	368,2	110	200,1 (10)	184,1 (10)	138,1 (30)	122,1 (30)	-	-	8,42

* Δm – a metabolit számított tömegkülönbsége az anyavegyülethez képest; Precursor – a metabolit számított protonált molekulaionja; FragV – fragmentor feszültség (V); Frag1-Frag6 (CE) – a számított fragmensek tömege (ütkezési energiájuk V-ban); R_t – retenció idő (perc)

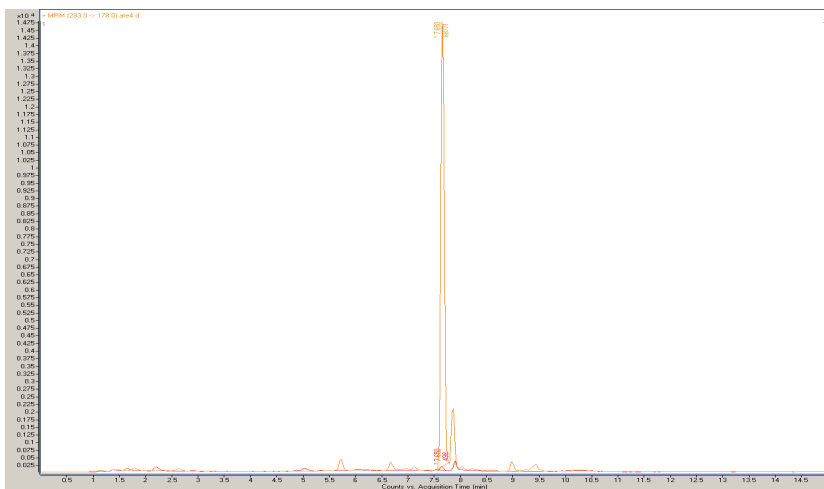
a: nem találtam információt az aktivitása vonatkozásán

b: két különböző biotranszformációs átalakulás ugyanazt a tömegkülönbséget eredményezi

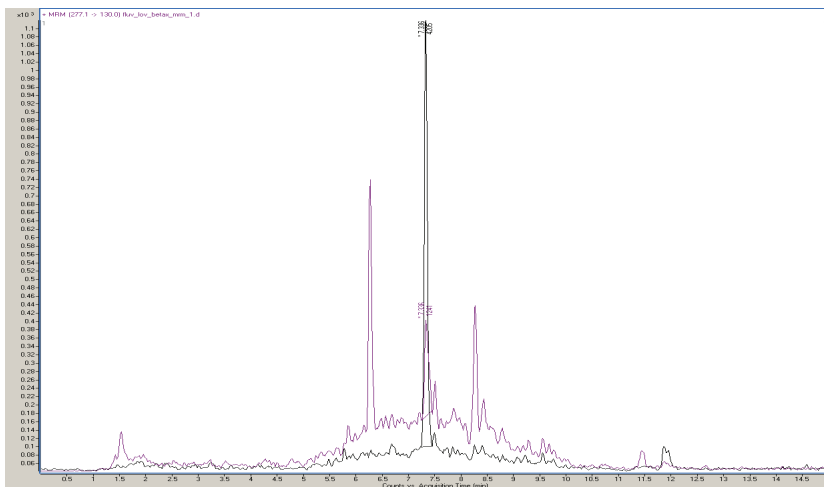
c: csak a hidroxil-csoportvasztatin találatom meg az irodalomban [117], a dihidroxil-szirmazek csak feltételezés

d: a metabolit aktivitása, amennyiben az anyavegyületét 100%-nak vesszük

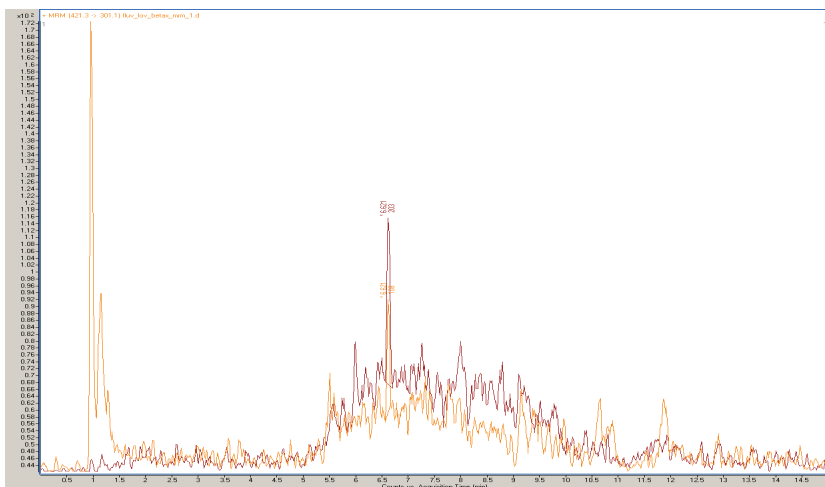
27. táblázat – A prediktív MRM módszerrel felépített átmenetek összefoglalása komponensenként



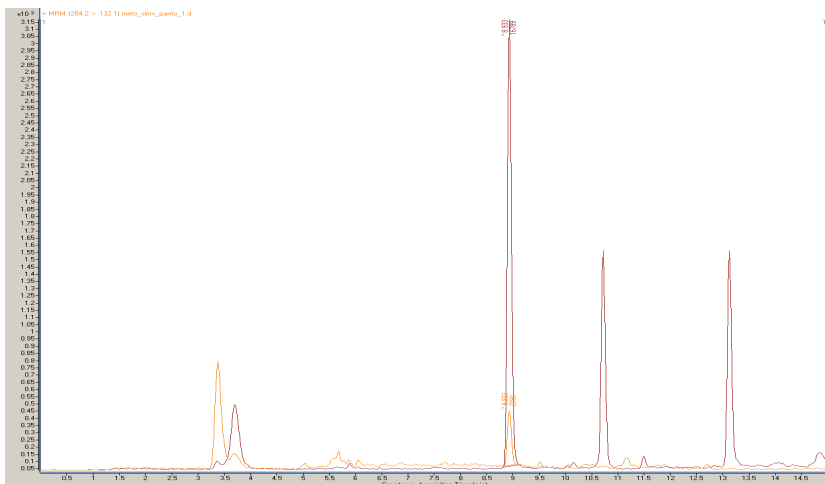
16. ábra – Hidroxil-atenolol MRM átmenetei (283 > 178 és 283 > 107) $R_t = 7,65$ percnél



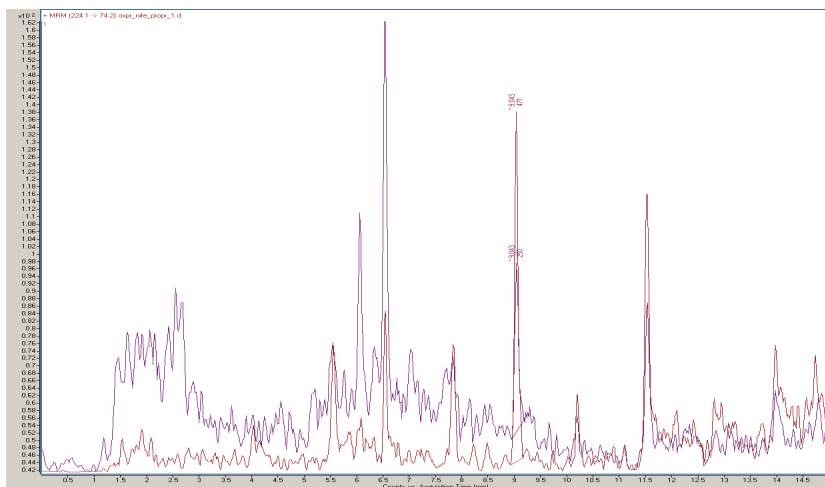
17. ábra – Betaxolol-savszármazékának MRM átmenetei (277,1 > 116,1 és 277,1 > 130)
 $R_t = 7,34$ percnél



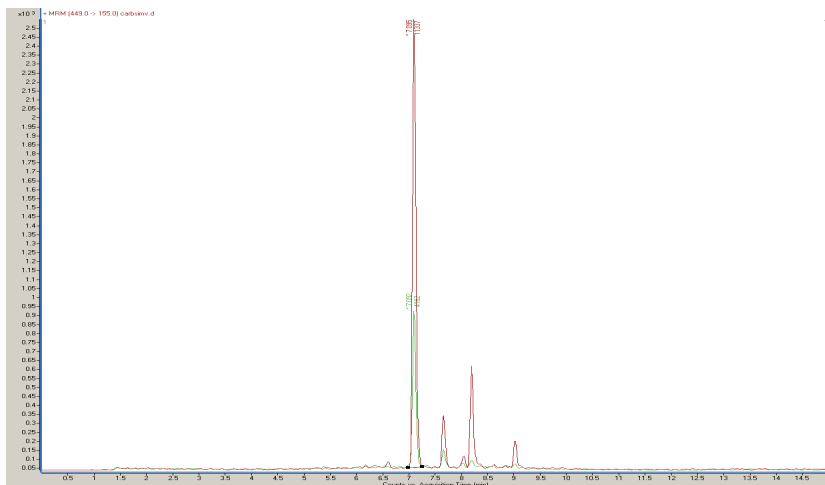
18. ábra – 6'-3''-hidroxil-lovasztatin MRM átmenetei (421,3 > 199,1 és 421,3 > 301,1)
 $R_t = 6,62$ percnél



19. ábra – α -hidroxil-metoprolol MRM átmenetei (284,2 > 132,1 és 284,2 > 74,1)
 $R_t = 8,93$ percnél



20. ábra – Dezizopropil-oxprenolol MRM átmenetei (224,1 > 72,2 és 224,1 > 74,2)
R_t = 9,04 percnél



21. ábra – 6'-karboxil-szimvasztatin MRM átmenetei (449 > 155 és 449 > 173)
R_t = 7,09 percnél

7.8.2 A kimutatott metabolitok igazolása LC-TOF-MS-sel

A prediktív módszerrel kimutatott metabolitok igazolását Agilent 6210 TOF készüléken végeztem, az előző pontban (7.8.1) részletezett minta-előkészítést és LC-s elválasztást követően, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben 10 µl mintatérfogatókat injektáltam az oszlopra. A készüléket pozitív ESI módban használtam, kis-tömeg kalibrációt („low-mass calibration”) követően. Az ionforrás paraméterei a következők voltak:

Száritógáz (N ₂) hőmérséklete	350 °C
Száritógáz (N ₂) áramlási sebessége	10 l/min
Porlasztógáz (N ₂) nyomása	35 psi
Kapilláris feszültség	3500 V
Oktopól RF	250 V
Skimmer 1	65 V

28. táblázat – Az ionforrás működési paraméterei a TOF készüléken

A vizsgálatokat három különböző fragmentor feszültség beállításnál (50, 100 és 150 V) végeztem el. Az adatokat folytonos (profil) módban rögzítettem annak érdekében, hogy minél több adatpontom legyen, a spektrumokat 50-1650 m/z tartományban vettem fel és ötöt átlagoltam az eredményekhez. A mérések során két referens tömeget használtam a pontos tömeg kalibrációhoz, melyek közrefogták a vizsgált molekulaionjaimat: 121,050873 és 922,009798.

A felvett totál ionkromatogramok kiértékelésekor a feltételezett metabolitok számított pontos tömegére (amelyeket a *Függelékben*, 10.4 fejezet foglaltam össze) extrahált ionkromatogramokat kértem a szoftvertől, majd a kapott tömegspektrumokra összegképlet javaslatokat generáltattam. A szoftver által javasolt összegképletet abban az esetben fogadtam el, amennyiben a számított és mért pontos tömeg közötti eltérés kisebb volt, mint 10 ppm, illetve ha a javasolt összegképletű molekula izotóp eloszlása nagymértékű hasonlóságot mutatott a számított izotóp eloszlással. Erre a kettős azonosítási kritériumra a megbízható eredmény érdekében volt szükségem. A kiértékeléshez Mass Hunter Qualitative Analysis B.03.01. szoftvert használtam.

A fenti elfogadási feltételeknek mindössze hat metabolit felelt meg a prediktív MRM módszerrel kimutatott 21 közül (ld. 29. táblázat), amely eredmény akár a TOF készülék kisebb érzékenységevel is magyarázható.

Metabolit	Összegképlet	FragV	Számított m/z	Mért m/z	Különbség (ppm)
Hidroxil-atenolol	$C_{14}H_{22}N_2O_4$	100	283,1652	283,1658	-2,12
Betaxolol-savszármazék	$C_{14}H_{21}NO_4$	50	268,1543	268,1562	-6,97
Hidroxil-lovasztatin	$C_{24}H_{36}O_6$	100	421,2585	421,2591	-2,26
Hidroxil-metoprolol	$C_{15}H_{25}NO_4$	100	284,1856	284,1841	+5,30
Dezizopropil-oxprenolol	$C_{12}H_{17}NO_3$	150	224,1281	224,1291	-4,55
Karboxil-szimvasztatin	$C_{25}H_{36}O_7$	100	449,2534	449,2524	+2,09

* FragV – Fragmentor feszültség (V)

29. táblázat – Megerősítő pontos tömeg mérések eredménye

Mindenképpen figyelemreméltó az a segítség, amit ez a kétlépcsős vizsgálat nyújtott egy esetleges kvantitatív és validálható analitikai módszer kidolgozásához gyógyszer-metabolitok felszíni vizekből történő meghatározása érdekében. Az analitikai módszerek kidolgozása általában a vizsgálandó standardek beszerzésével kezdődik, ami az én esetemben közel száz standard megvásárlását jelentette volna, ha nem végzem el ezt a kvalitatív szűkítő vizsgálatot. Azonban a predikciós módszert követően már csak 21 metabolit vált relevánssá a későbbi módszer kidolgozásához, ami jelentősen csökkenti a költségeket.

7.9 Környezetterhelés-vizsgálat

A vizsgálat célja többértű volt:

- felmérni a Budapestet Budáról körülölelő főbb patakok szennyezettségét (az általam vizsgált komponensekre nézve);
- vizsgálni a különböző szennyvíztisztító telepek hozzájárulását a patakokban mérhető koncentrációkhoz;
- követni az évszakos változások befolyását a mérhető koncentrációkra;
- megbecsülni a Dunába – Buda felől - beömlő gyógyszer-maradék mennyiséget éves szinten.

Első lépésként feltérképeztem a budai oldal vízfolyásait, a környező települések populációját, a csatornázottság mértékét és a szennyvíztisztító-telepek elrendezését is. Ezekből az adatokból felépítettem egy vizsgálati tervet a két fő patakra – Aranyhegyi- és Hosszúrét-patak - nézve.

Az Aranyhegyi-patak a Pilisben ered, a Vörösvári-árokban halad végig, majd az Újpesti vasúti hid lábánál éri el a Dunát. Hossza kb. 23 km, vízgyűjtő területe 120 km². Három számottevő mellékvízfolyása van: a Borosjenői-patak, a Paprikás-patak és a Határréti-patak. Vízgyűjtő területén hat nagyobb település található (Pilisvörösvár, Pilisszentiván, Pilisszántó, Solymár, Pilisborosjenő, Üröm), közel 41 ezer lakossal és Budapest-Óbudán is végigfolyik, mielőtt a Dunába ömlene. A területen három szennyvíztisztító-telep található: Pilisvörösváron III. fokozatú, Solymáron és Pilisborosjenőn II. fokozatúak. Pilisszentiván Solymárra, Üröm az Észak-pesti szennyvíztisztító-telepre vezeti szennyvizét. Pilisszántó csatornázatlansága viszont diffúz szennyezést okozhat.

A Hosszúrét-patak a Torbágyi-erdőben ered, hossza 17 km, vízgyűjtő területe 114 km², több mint 55 ezer lakossal. Három jelentős mellékága van: a Törökbálinti-, a Budakeszi- és a Budaörsi-mellékág. A patak Törökbálint, Budaörs és Budapest-Budafok településeket érinti, mielőtt elérné a Dunát. A patak mentén három szennyvíztisztító-telep található: a törökbálinti- és a budakeszi-szennyvíztisztító III. fokozatú, míg a budaörsi II. fokozatú. Továbbá az Újbuda Tóváros Lakópark mellett a patakot felduzzasztották, hogy javítsák a vízminőséget.

A mintavételi pontok helyszínét a tisztítótelepek elrendezése és a mellék-ágak befolyása alapján választottam ki, illetve a Hosszúréti-patak vonalán található duzzasztó hatásának vizsgálatára érdekében az elé és mögé is helyeztem mintavételi pontot.

Az Aranyhegyi-patak vonalán összesen 11 pontot, a Hosszúréti-n 7 pontot jelöltem ki, továbbá az Ördög-árok nevű befolyási helyet is mintáztam az Erzsébet-híd lábánál. A 22. ábrán nyílak segítségével jelöltem azokat a pontokat, amelyeknél a későbbiekben már nem vettem mintákat. Minden ponton 3x500 ml vízmintát vettem, mértem a hőmérsékletét és még a helyszínen adalékoltam 500 µl belső-standard keverék-oldattal, ami mind a négy belső standardot 50 ng/ml-es koncentrációban tartalmazott. A mintaelőkészítést a IV-es extrakciós módszer (ld. 16. táblázat) szerint, az LC-MS/MS mérést pedig a 7.4-es pontban részletezett validált módszerrel végeztem el.

A kapott eredményeket a 30 - 32. táblázatokban foglaltam össze. A táblázatokban csak azokat a komponenseket tüntettem fel, amelyeket detektáltam valamelyik mintában. Az Aranyhegyi-patak esetén kiválasztott 11 mintavételezési pontból három (pilisvörösvári szennyvíztisztító felett, Paprikás patak és Határ-réti patak) esetén semelyik komponens sem volt detektálható, ezért ezeket a pontokat is kihagytam a táblázatból. A 22. ábrán ezeket a pontokat szaggatott nyílak segítségével jelöltem.

Komponensek	Koncentráció (ng/l)						
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Atenolol	25	73	118	85	51	79	66
Atorvasztatin	22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Famotidin	60	<LOQ	300<	300<	195	120	27
Metoprolol	75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nizatidin	n.d.	n.d.	57	<LOQ	n.d.	<LOQ	7
Pantoprazol	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ramipril	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ranitidin	60	n.d.	300<	205	60	146	62
Sotalol	72	126	300<	300<	226	300<	211

1: Törökbálinti szennyvíztisztító felett;

2: Törökbálinti és budaörsi telepek között

3: Törökbálinti és budaörsi telepek alatt;

4: Hosszúréti-patak a budaörsi mellékág felett

5: Budaörsi mellékág alatt, duzzasztó előtt;

6: Duzzasztó után

7: Torkolat

n.d. – nem detektálható; 300< - a mért koncentráció a kalibrációs tartomány felső határán kívül esett;
<LOQ – meghatározási határ alatt detektálható

30. táblázat – A Hosszúréti-patak mintáinak eredményei

Komponensek	Koncentráció (ng/l)							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Atenolol	182	98	35	n.d.	91	34	30	29
Atorvasztatin	300<	98	19	n.d.	n.d.	14	13	17
Enalapril	48	5	<LOQ	31	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Famotidin	300<	300<	30	22	71	n.d.	92	85
Fluvasztatin	191	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Metoprolol	300<	300<	136	n.d.	257	196	171	115
Nifedipin	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nimodipin	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nizatidin	63	23	<LOQ	n.d.	268	12	8	33
Pantoprazol	14	13	<LOQ	n.d.	193	5	<LOQ	<LOQ
Propranolol	<LOQ	19	n.d.	n.d.	<LOQ	5	n.d.	n.d.
Ramipril	73	8	<LOQ	n.d.	12	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ranitidin	300<	300<	174	n.d.	297	187	145	153
Sotalol	300<	156	65	n.d.	300<	63	68	62

1: Pilisvörösvári szennyvíztisztító alatt;

2: Solymári szennyvíztisztító alatt

3: Aranyhegyi-patak, Pilisborosjenő felett;

4: Pilisborosjenői szennyvíztisztító felett

5: Pilisborosjenői szennyvíztisztító felett;

6: Bécsi-út

7: Szentendrei-út;

8: Torkolat

n.d. – nem detektálható; 300< - a mért koncentráció a kalibrációs tartomány felső határán kívül esett; <LOQ – meghatározási határ alatt detektálható

31. táblázat – Az Aranyhegyi-patak mintáinak eredménye

Komponensek	Koncentráció (ng/l)
Atenolol	<LOQ
Enalapril	<LOQ
Metoprolol	6
Ramipril	<LOQ
Sotalol	<LOQ
<LOQ – meghatározási határ alatt detektálható	

32. táblázat – Az Ördög-árok torkolati mintáinak eredményei

Az eredmények kiértékelését követően szűkítettem a mintavételi pontok számát. Kihagytam azokat a pontokat, amelyeknél nem volt mérhető gyógyszermaradék a mintában, vagy nem mutatott eltérést a megelőző ponthoz képest. Erre a szűkítésre főként

gazdaságossági szempontból volt szükség. Ezen kívül kibővítettem a kalibrációs tartományt – lovasztatin és szimvasztatin kivételével - egészen 6000 ng/ml-ig, ugyanis egyes esetekben rendkívül nagy koncentráció-értékeket mértem a mintákban. A kibővített kalibrációs tartományban felvett görbékre kapott regressziós koefficiens értékek minden komponens esetén 0,99-nél nagyobbak adódtak. Lovasztatin és szimvasztatin esetén ez az érték csak 0,81-nek adódott, illetve a mérési eredmények sem indokolták a bővítés szükségességét, ezért ezekre a komponensekre megtartottam az eredeti tartományt.

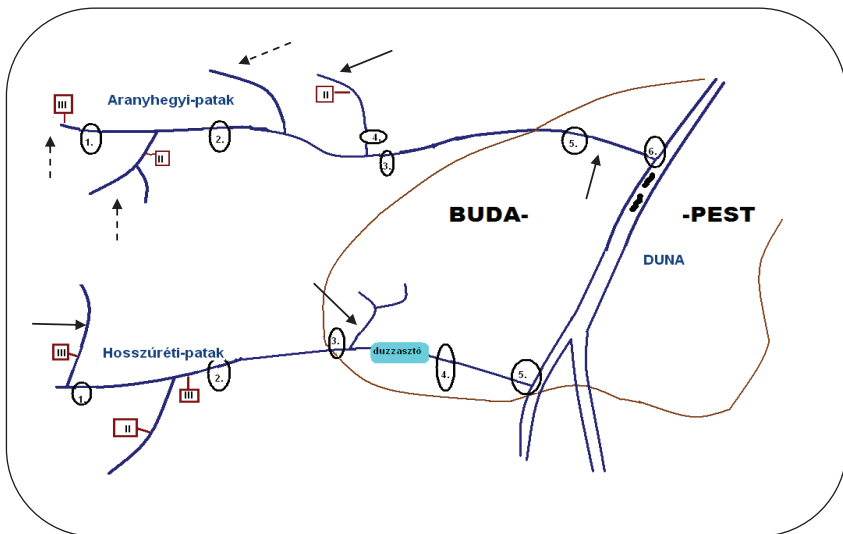
A továbbiakban háromhavonta ismételtam a mintavételezést összesen 11 ponton. A minden évszakban történő mintavételezéssel az időjárási viszonyok (csapadék-mennyiség, napsütöses órák száma, átlag hőmérséklet) hatását követtem. Az Aranyhegyi-patak mentén hat mintavételezési pontot jelöltem ki:

- 1) a III. fokozatú szennyvíztisztító-telep után;
- 2) az egyik II. fokozatú telep és a Paprikás-patak befolyása után;
- 3) a másik II. fokozatú telep és a Borosjenői-patak befolyása után, ahol a diffúz szennyezés is várható;
- 4) itt a Borosjenői-patakban történt a mintavételezés;
- 5) Bécsi-úti kereszteződés, ahol a patak beér Budapestre;
- 6) Óbudai-torkolat, ahol a patak a Dunába ömlik.

A Hosszúréti-patak mentén öt mintavételezési pontot választottam ki:

- 1) a Budakeszi-mellékág befolyása és az egyik III. fokozatú szennyvíztisztító-telep után;
- 2) a Törökbálinti-mellékág befolyása és a II. fokozatú, illetve a másik III. fokozatú telep után;
- 3) a Budaörsi-mellékág befolyása és a duzzasztó előtt;
- 4) a vízminőség javítását célzó duzzasztó után;
- 5) torkolati minta.

A mintavételezési pontok, a II. és III. fokozatú szennyvíztisztító-telepek, illetve a duzzasztó elhelyezkedését a 22. sematikus ábrán jelöltem. Az ábrán nyílak segítségével jelöltem az eredetileg kijelölt, de később elhagyott pontok helyét, illetve szaggatott nyilakkal jelöltem azokat a pontokat, amelyeknél nem volt detektálható komponens.



22. ábra – Mintavételezési pontok és szennyvíztisztító-telepek elhelyezkedése a két patak mentén

A mintákat minden esetben a patak keresztmetszetének közepéről, 10 cm-es mélységből vettem, egy műanyag-vödör segítségével. Az 500 ml-es térfogatot mérőhengerrel mértem ki, majd öntöttem bele a patakvízzel kiöblített barna üvegbe és ezután adalékoltam az 500 µl belső standard oldat-keveréket (50 ng/ml mind a négy belső standardra nézve) a mintához. Minden ponton három párhuzamos mintát gyűjtöttem. Mértem a minták hőmérsékletét és pH-ját, illetve monitoroztam a levegő átlaghőmérsékletét és a lehullott csapadékmennyiséget. A mintavételezések részleteit a 32. táblázatban foglaltam össze.

Mintavétel időpontja	Levegő hőm. (°C)	Átlagos vízhőm. (°C)	Víz minta pH	Csapadék menny. (mm/nap)
2010. április	7	10,6	7,8 – 8,2	9
2010. július	27	25,3	7,8 – 8,2	0
2010. október	15	12,6	7,8 – 8,2	0,5
2011. január	0	4,3	7,8 – 8,2	7

33. táblázat – Mintavételezések időpontja és részletei

Az egy éven át tartó mintavételezés során a keresett 26 komponens közül 25-öt detektáltam valamely mintában, csak a gyomorsav-csökkentő cimetidint nem sikerült kimutatnom egyszer sem. Öt szívgyógyszert (acebutolol, amlodipin, carvedilol, nifedipin, szimvasztatin) csak nagyon elvétve tudtam kimutatni, továbbá hármat közülük (acebutolol, amlodipin, carvedilol) csak az Aranyhegyi-patakból. Egyes komponensek csak bizonyos hónapokban voltak detektálhatók és nem sikerült minden alkalommal kimutatnom őket: csak októberben találtam acebutolol, amlodipin és lovasztatin szívgyógyszereket; októberben és januárban betaxolol, carvedilol, esmolol és szimvasztatin szívgyógyszereket; továbbá csak októberben és júliusban találtam fluvasztatin szívgyógyszert és lansoprazol, omeprazol gyomorsav-csökkentőket a mintákban. Az oxprenolol szívgyógyszer csak januárban volt detektálható, míg az enalapril július kivételével minden alkalommal, illetve az atorvasztatin és az enalapril szívgyógyszerek januárban csak a Hosszúréti-patak mintáiban fordultak elő. Ezzel szemben a lisinopril szívgyógyszert júliusban és januárban az Aranyhegyi-patakból, míg októberben és januárban a Hosszúréti-patakból sikerült kimutatnom. A 34. táblázatban összefoglaltam az átlag-, minimum- és maximum koncentrációkat minden komponensre nézve.

Az átlag-koncentrációkat tekintve legjelentősebb mennyiségben a gyomorsav-csökkentő famotidin és ranitidin, illetve a szívgyógyszer metoprolol, sotalol, acebutolol és atorvasztatin – ezutóbbi kettő csak az Aranyhegyi-patakból – volt mérhető.

Komponens	Koncentrációk (ng/l)					
	Aranyhegyi patak			Hosszúréti patak		
	Min.	Max.	Átlag	Min.	Max.	Átlag
Acebutolol	16	261	98	-	-	-
Amlodipin	25	25	25	-	-	-
Atenolol	8	168	55	22	138	68
Atorvasztatin	8	1102	114	12	125	33
Betaxolol	11	135	58	17	41	27
Carvedilol	12	58	41	-	-	-
Enalapril	1	42	8	2	49	13
Esmolol	<LOQ	121	41	<LOQ	40	18
Famotidin	12	782	153	11	528	150
Fluvasztatin	11	150	56	2	9	5
Lansoprazol	<LOQ	10	7	<LOQ	650	87
Lisinopril	13	32	18	13	26	20
Lovasztatin	<LOQ	11	10	10	12	11
Metoprolol	143	6944	1230	77	1150	525
Nifedipin	<LOQ	24	21	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Nimodipin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Nizatidin	2	425	52	6	58	24
Omeprazol	6	9	8	6	6	6
Oxprenolol	<LOQ	34	14	<LOQ	15	14
Pantoprazol	4	166	32	4	40	15
Propranolol	2	189	36	7	65	29
Ramipril	3	56	14	4	33	13
Ranitidin	5	1451	257	15	478	167
Szimvasztatin	11	16	13	11	71	31
Sotalol	50	663	160	76	496	211

<LOQ – meghatározási határ alatt detektálható

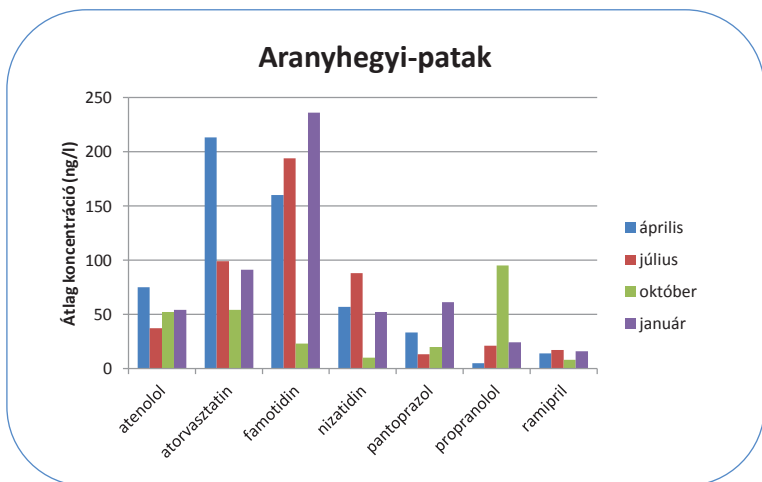
34. táblázat – Patakokban mért átlag-, minimum- és maximum koncentrációk

Tíz komponenst tudtam kiválasztani a szezonális, illetve a mintavételi pontonkénti változások követésére, amelyek minden alkalommal, minden ponton vett mintából kimutathatók voltak. A kiválasztott komponensek közül négy β -blokkoló (atenolol, metoprolol, propranolol, sotalol), egy ACE-inhibitor (ramipril), egy HMG CoA reduktáz inhibitor (atorvasztatin), három H_2 -receptor antagonist (famotidin, nizatidin, ranitidin) és egy protonpumpa inhibitor (pantoprazol).

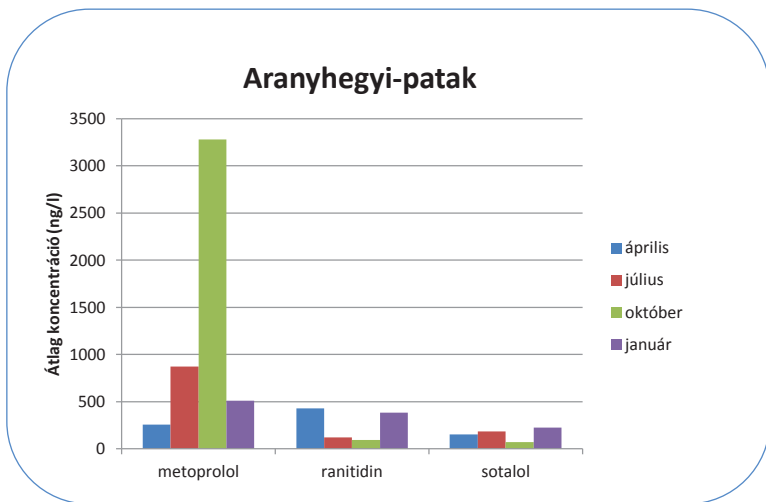
A szezonális változások követésére a komponensek különböző mintavételi pontokon mért koncentrációit átlagoltam az adott hónapban. Az eredményeket a 35. táblázatban, illetve a 23 – 26. ábrákon foglaltam össze. Az eredmények könnyebb áttekinthetőségének érdekében a patakonkénti ábrákat is kettéválasztottam.

Komponens	Átlag koncentrációk (ng/l)							
	Aranyhegyi patak				Hosszúrétai patak			
	Április	Július	Október	Január	Április	Július	Október	Január
Atenolol	75	37	52	54	76	38	65	92
Atorvasztatin	213	99	54	91	-	-	-	-
Famotidin	160	194	23	236	225	94	32	247
Metoprolol	257	871	3279	511	77	677	785	561
Nizatidin	57	88	10	52	30	13	11	41
Pantoprazol	33	13	20	61	4	14	28	12
Propranolol	5	21	95	24	7	32	46	30
Ramipril	14	17	8	16	8	26	8	8
Ranitidin	429	122	93	385	158	102	60	347
Sotalol	154	184	73	227	314	154	174	203

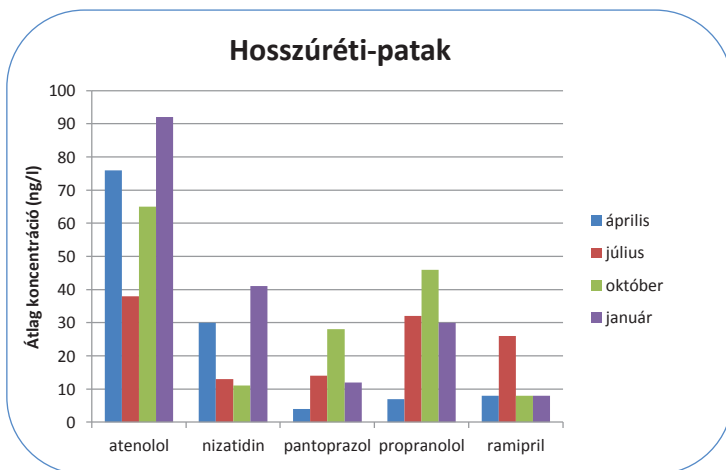
35. táblázat – A komponensek koncentrációinak szezonális változása



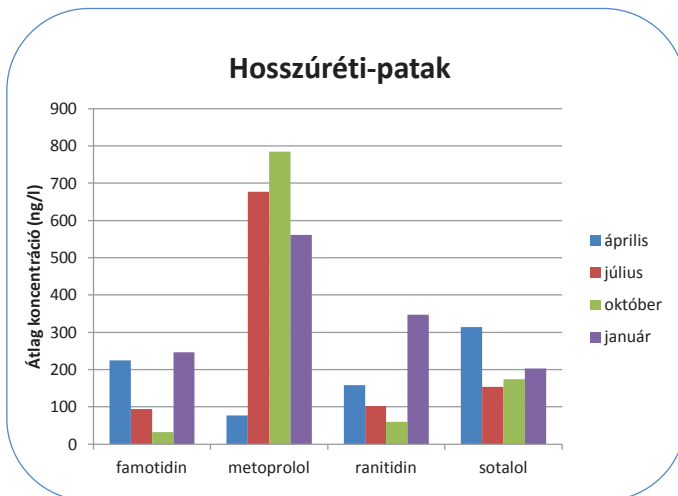
23. ábra – Koncentrációk szezonális változása Aranyhegyi-patak esetén I.



24. ábra – Koncentrációk szezonális változása Aranyhegyi-patak esetén II.



25. ábra – Koncentrációk szezonális változása Hosszúréti-patak esetén I.



26. ábra – Koncentrációk szezonális változása Hosszúréti-patak esetén II.

Összességében a legnagyobb mennyiségben a β -blokkoló metoprolol volt mérhető mindkét patakából, a legmagasabb koncentrációt októberben elérve. Az Aranyhegyi-patak mintáit tekintve nem tapasztaltam jelentős változást az atenolol, pantoprazol és ramipril mért koncentrációiban, míg a famotidin, a nizatidin és a sotalol jóval kisebb koncentrációiban volt jelen az októberi mintákban, mint a másik három hónapban. Jelentősen nagyobb koncentrációban volt jelen az atorvasztatin az áprilisi, a propranolol az októberi és a ranitidin a januári és áprilisi mintákban, mint a többi hónapban.

A Hosszúréti-patak mintáit tekintve általánosságban megállapítható az, hogy ez a patak kevésbé szennyezett, jóval kisebb mennyiségben található az itteni mintákban gyógyszermaradék. Az atenolol és a nizatidin nagyon hasonló koncentrációkat mutatott minden hónapban, míg a pantoprazol és a propranolol az áprilisi mintákban jóval kisebb mennyiségben volt jelen, mint a többiben. Kiemelkedően magas koncentrációban volt jelen a famotidin az áprilisi- és a januári-, a ramipril a júliusi-, a ranitidin a januári- és a sotalol az áprilisi mintákban.

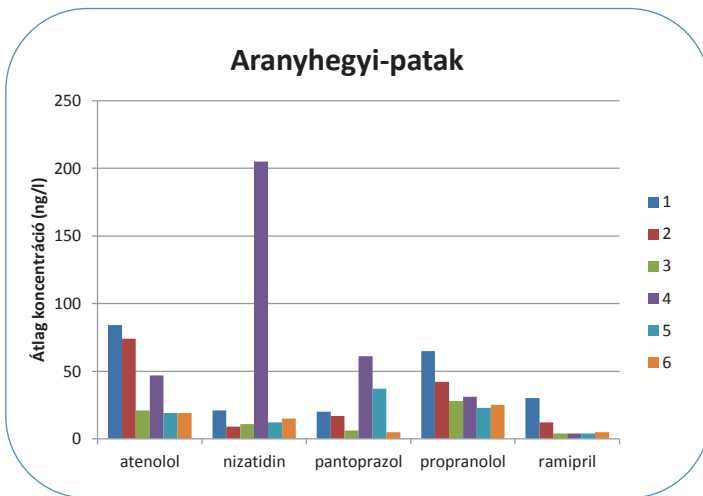
A fenti eredmények alapján nem állapítható meg azonos tendencia a tíz komponens koncentrációinak évszakok szerinti változására nézve, így arra a következtetésre jutottam,

hogy az időjárási viszonyok kevésbé meghatározóak a komponensek megjelenésében, mint azok fizikai-kémiai tulajdonságai. Ezutóbbiak azonban jelentősen befolyásolják az adott komponens perzisztenciáját, az eltávolítás hatékonyságát, illetve a különböző átalakulási folyamatokat a környezetben.

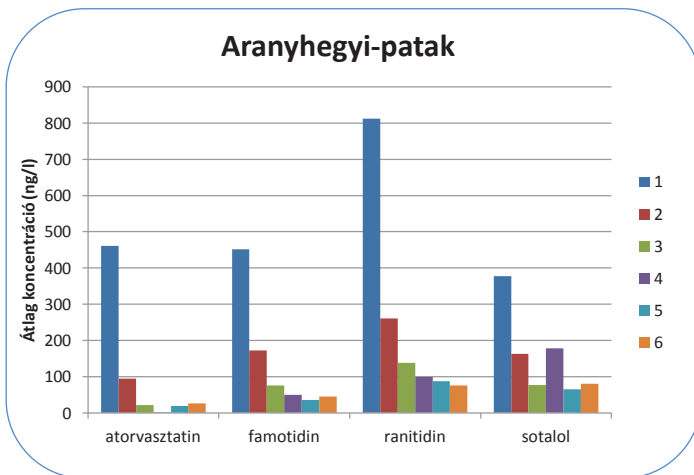
Annak érdekében, hogy a szennyvíztisztító-telepek és a mellékágak befolyásának hatását tudjam vizsgálni a négy különböző hónapban mért koncentrációkat átlagoltam az adott mintavételi pontra, a kiválasztott tíz komponens esetében. Az eredményeket a 36. táblázatban és a 27 – 31. ábrákon foglaltam össze. Az eredmények könnyebb áttekinthetősége érdekében ebben az esetben is kettéválasztottam a patakonkénti eredményeket. Továbbá Aranyhegyi-patak esetén a metoprololt teljesen külön ábrázoltam, mert egy nagyságrenddel nagyobb koncentráció értékeket vesz fel az egyes pontokon, mint bármely másik komponens.

Komponens	Átlag koncentrációk (ng/l)										
	Aranyhegyi patak					Hosszúréti patak					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5
Atenolol	84	74	21	47	19	19	19	89	69	70	59
Atorvasztatin	461	95	22	2	19	26	-	-	-	-	-
Famotidin	452	173	76	50	36	45	47	198	254	83	112
Metoprolol	2534	1763	729	797	688	865	267	688	668	480	445
Nizatidin	21	9	11	205	12	15	10	38	27	20	14
Pantoprazol	20	17	6	61	37	5	7	16	21	8	7
Propranolol	65	42	28	31	23	25	20	36	31	23	19
Ramipril	30	12	4	4	4	5	8	11	14	4	2
Ranitidin	812	261	138	99	88	76	105	265	189	1480	103
Sotalol	377	163	77	178	65	80	104	274	254	261	164

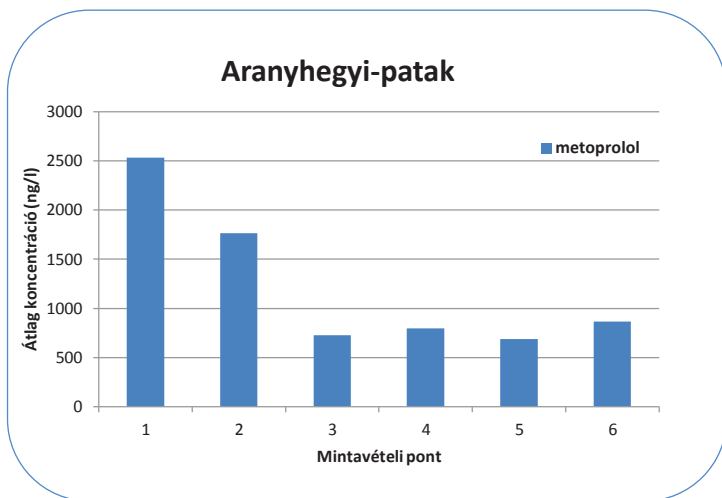
36. táblázat – A komponensek koncentrációinak mintavételi pontonkénti változása



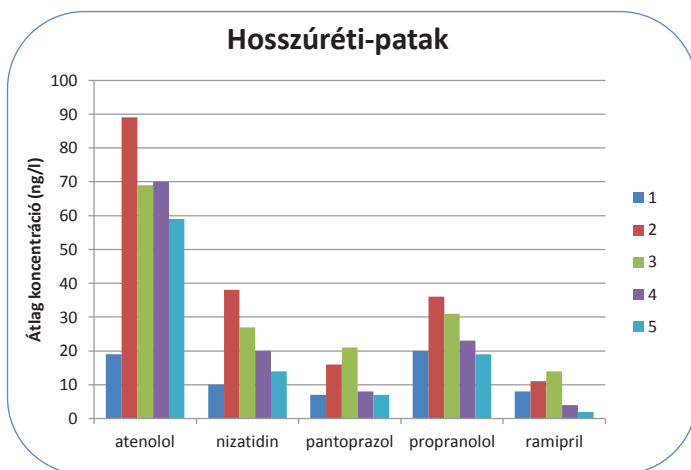
27. ábra – Koncentrációk pontonkénti változása Aranyhegyi-patak esetén I.



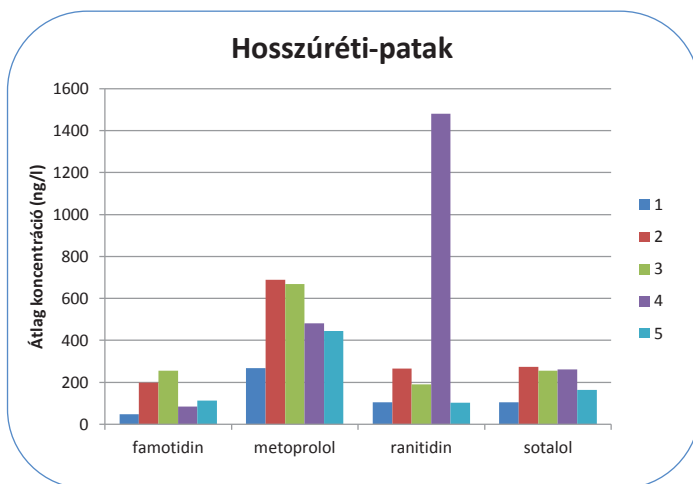
28. ábra – Koncentrációk pontonkénti változása Aranyhegyi-patak esetén II.



29. ábra – Metoprolol koncentrációjának pontonkénti változása Aranyhegyi-patak esetén



30. ábra – Koncentrációk pontonkénti változása Hosszúréti-patak esetén I.



31. ábra – Koncentrációk pontonkénti változása Hosszúréti-patak esetén II.

Ebben az esetben megfigyelhető egy általános tendencia a komponensek koncentrációinak változásában. Az Aranyhegyi-patak mintáit tekintve egy folyamatos koncentráció-csökkenés látható a harmadik mintavételi pontig, köszönhetően a mellékágak befolyása okozta jelentős hígító hatásnak, ami még a tisztító-telepek szennyezett vízének befolyását is ellensúlyozza. Mint említettem a negyedik mintavételi pontot a Pilisborosjenői-mellékágon jelöltem ki, a II. fokozatú szennyvíztisztító-telep után. Megfigyelve a negyedik ponton mért koncentrációkat jól látható a telep szennyezett vízének hozzájárulása a komponensek mérhető koncentrációjához, kivéve az atorvasztatin és a ramipril esetén. Összehasonlítva a harmadik és az ötödik mintavételi ponton mért koncentrációkat négy komponens mennyisége gyakorlatilag változatlan (atenolol, atorvasztatin, nizatidin, ramipril), öt komponens mennyisége mutat csökkenést (famotidin, metoprolol, propranolol, ranitidin, sotalol), míg a pantoprazol koncentrációja érdekes módon megnőtt. Ezutóbbi komponens esetén az elkeveredés, leülepedés és hígulás sem tudta olyan mértékben ellensúlyozni a negyedik ponton monitorozott befolyó szennyezést, mint a másik kilenc komponens esetén. Végül összehasonlítva a két utolsó mintavételi pont koncentrációit és megjegyezve azt a tényt, hogy elméletileg nem található szennyezés

forrása a két pont között, megállapítható, hogy egyes komponensek (atorvasztatin, famotidin, metoprolol, sotalol) mennyisége valamelyest nőtt a torkolati mintákban. Ezt az eredményt csak illegális szennyvíz-bevezetéssel vagy a gyógyszerek nem megfelelő hulladékkezelésével tudom magyarázni.

A Hosszúréti-patak esetén jól megfigyelhető az első két pont között található két tisztító-telep hozzájárulása a mérhető koncentrációkhoz, hisz jelentős növekedés tapasztalható, kivéve a ramipril esetében. A második és harmadik pont között pusztán hígulást vártam, azaz a koncentrációk csökkenését, mégis három komponens (famotidin, pantoprazol, ramipril) mennyisége éppen ellenkezőleg változott. Abból kiindulva, hogy a negyedik mintavételi pontot a vízminőség-javító duzzasztó után jelöltem ki, kizárólag koncentráció-csökkenést vártam ezekben a mintákban. Ezzel szemben kismértékű növekedést tapasztaltam atenolol és sotalol esetén, míg rendkívül nagymértékű – közel nyolcszoros – koncentráció-emelkedést mértem ranitidin esetén. Ez a növekedés nagy valószínűséggel a duzzasztó tóban található mikroorganizmusok aktivitásának köszönhető, amelyek képesek a gyógyszerek - II. fázisú biotranszformációjakor keletkező - glükuronid konjugátumait visszalakítani az anyavegyületté, amit már néhány komponensre bizonyítottak is [20,39-42]. Tekintve a torkolati mintákat, szinte az összes komponens mennyisége csökkent, kivéve a famotidint, amit ebben az esetben is csak nem várt szennyezés-forrással (illegális bevezetés vagy nem megfelelő hulladékkezelés) tudok magyarázni.

Az éves terhelés-becslés elvégzéséhez a torkolati mintavételezés során minden alkalommal meghatároztam a patak áramlási sebességét, egyenlő nagyságú fadarabok 10-12 m megtételéhez szükséges átlagidejének mérésével. Továbbá lemértem a patak mélységét és keresztmetszetét a kibetonozott mederben. Ezekből az adatokból vízhozam-értékeket számítottam a következők szerint.

Lemértem a patakok kibetonozott medrének szélességét (jelölése: a [m]), ami mindvégig állandó volt, illetve minden mintavételezéskor lemértem a patakok mélységét (jelölése: m [m]) is.

A két adat szorzatából kaptam meg a patakok keresztmetszvényét: $A = a \cdot m$ [m²]

Minden mintavételezés alkalmával kimértem egy 10-12 m-es szakaszt (jelölése: x [m]), ahol mértem az öt egyenlő méretűre vágott fadaraboknak a kimért út megtételéhez szükséges idejét (jelölése: t [s]).

A patakvíz aktuális áramlási sebességét a kimért út és az annak megtételéhez szükséges idő átlagának hányadosából számítottam:

$$v = x/t \text{ [m/s]}$$

A patak aktuális vízhozamát pedig a kereszt-szelvény és az áramlási sebesség szorzatából számítottam:

$$Q = A \cdot v \text{ [m}^3\text{/s].}$$

A vízhozam-számításhoz felhasznált adatokat és a számítás eredményét a két patakra a 37-38. táblázatokban foglaltam össze.

Aranyhegyi-patak, szélessége: $a_A = 1,47 \text{ m}$						
Dátum	Vízmélység (m)	Kereszt- szelvény (A)	Út (x)	Idő átlaga (t)	Vízsebesség (v)	Vízhozam (Q)
2010.04.06.	0,29 m	0,4263 m ²	10 m	6,4317 s	1,5548 m/s	0,6628 m ³ /s
2010.07.20.	0,13 m	0,1911 m ²	10 m	9,3640 s	1,0679 m/s	0,2041 m ³ /s
2010.10.25.	0,31 m	0,4557 m ²	12 m	8,6840 s	1,3819 m/s	0,6297 m ³ /s
2011.01.23.	0,50 m	0,7350 m ²	12 m	10,947 s	1,0962 m/s	0,8057 m ³ /s

37. táblázat – Vízhozam számítás és eredménye az Aranyhegyi-patakra

Hosszúréti-patak, szélessége: $a_H = 1,24 \text{ m}$						
Dátum	Vízmélység (m)	Kereszt- szelvény (A)	Út (x)	Idő átlaga (t)	Vízsebesség (v)	Vízhozam (Q)
2010.04.12.	0,360 m	0,4464 m ²	12 m	7,2700 s	1,6506 m/s	0,7368 m ³ /s
2010.07.20.	0,385 m	0,4774 m ²	10 m	8,0863 s	1,2367 m/s	0,5904 m ³ /s
2010.10.25.	0,290 m	0,3596 m ²	12 m	9,6640 s	1,2417 m/s	0,4465 m ³ /s
2011.01.23.	0,700 m	0,8680 m ²	12 m	24,798 s	0,4839 m/s	0,4200 m ³ /s

38. táblázat - Vízhozam számítás és eredménye a Hosszúréti-patakra

Minden hónapban a torkolati mintákban mért koncentrációkból (ng/l-ben) és a kiszámított vízhozam adatokból (m³/s-ban) éves környezetterhelés-becslést adtam meg az adott komponensre nézve, kg/év-es egységben. Illetve a havi adatokból egy átlagot is számítottam, amely eredményeket a 39-40. táblázatban foglaltam össze.

Komponensek	Aranyhegyi patak								
	Torkolati koncentrációk (ng/l)				Éves terhelés (kg/év)				
	Április	Július	Október	Január	Április	Július	Október	Január	Átlag
Atenolol	31	19	-	25	0,65	0,12	-	0,64	0,35
Atorvasztatin	19	51	12	20	0,40	0,33	0,24	0,51	0,37
Betaxolol	-	-	-	19	-	-	-	0,48	0,12
Carvedilol	-	-	45	11	-	-	0,89	0,28	0,29
Enalapril	3	6	<LOQ	4	0,06	0,04	-	0,10	0,05
Esmolol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Famotidin	59	-	12	107	1,23	-	0,24	2,72	1,05
Fluvasztatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lansoprazol	-	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-	-
Lisinopril	-	15	-	-	-	0,10	-	-	0,03
Lovasztatin	-	-	11	-	-	-	0,22	-	0,06
Metoprolol	156	587	2486	229	3,26	3,78	49,37	5,82	15,6
Nimodipin	-	-	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-
Nizatidin	31	25	-	5	0,65	0,16	-	0,13	0,24
Omeprazol	-	-	9	-	-	-	0,18	-	0,05
Oxprenolol	-	-	-	9	-	-	-	0,23	0,06
Pantoprazol	<LOQ	<LOQ	15	-	-	-	0,30	-	0,08
Propranolol	-	10	70	20	-	0,06	1,39	0,51	0,49
Ramipril	3	17	-	-	0,06	0,11	-	-	0,04
Ranitidin	146	29	-	128	3,05	0,19	-	3,25	1,62
Szimvasztatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sotalol	68	99	64	88	1,42	0,64	1,27	2,24	1,39

<LOQ – meghatározási határ alatt detektálható

39. táblázat – Éves környezetterhelés-becslés eredménye az Aranyhegyi-patakából

Komponensek	Hosszúréti patak								
	Torkolati koncentrációk (ng/l)				Éves terhelés (kg/év)				
	Április	Július	Október	Január	Április	Július	Október	Január	Átlag
Atenolol	65	22	56	92	1,51	0,41	0,79	1,22	0,98
Atorvasztatin	-	-	<LOQ	52	-	-	-	0,69	0,17
Betaxolol	-	-	24	32	-	-	0,34	0,42	0,19
Carvedilol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enalapril	-	-	-	17	-	-	-	0,23	0,06
Esmolol	-	-	25	<LOQ	-	-	0,35	-	0,09
Famotidin	51	-	47	350	1,19	-	0,66	4,64	1,62
Fluvasztatin	-	-	<LOQ	-	-	-	-	-	-
Lansoprazol	-	-	<LOQ	-	-	-	-	-	-
Lisinopril	-	-	-	19	-	-	-	0,25	0,06
Lovasztatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metoprolol	-	293	823	665	-	5,46	11,59	8,81	6,47
Nimodipin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nizatidin	9	-	7	39	0,21	-	0,10	0,52	0,21
Omeprazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxprenolol	-	-	-	13	-	-	-	0,17	0,04
Pantoprazol	-	-	21	6	-	-	0,30	0,08	0,10
Propranolol	-	-	43	33	-	-	0,61	0,44	0,26
Ramipril	-	-	5	4	-	-	0,07	0,05	0,03
Ranitidin	74	-	63	275	1,72	-	0,89	3,64	1,56
Szimvasztatin	-	-	28	-	-	-	0,39	-	0,10
Sotalol	214	76	116	249	4,97	1,42	1,63	3,30	2,83

<LOQ – meghatározási határ alatt detektálható

40. táblázat – Éves környezetterhelés-becslés eredménye a Hosszúréti-patakból

Összességében 21 komponenst sikerült kimutatnom a torkolati mintákból. Általában a célkomponensek éves környezetterhelése nem éri el az egy kilogrammot, azonban egyes komponensek bőven meghaladják azt. Ilyen komponensek a β -blokkoló metoprolol és sotalol, illetve a H_2 -receptor antagonistá famotidin és ranitidin mindkét patakából; továbbá a Hosszúréti-patakából a β -blokkoló atenolol is megközelíti az éves egy kg-os mennyiséget. Jobban megfigyelve az adatokat, szembetűnő, hogy a metoprolol becsült mennyisége minden hónap adatai alapján meghaladja a három kg-ot és az átlagos mennyiség is több mint 15 kg az Aranyhegyi-patakából. Ezt kiegészítve azzal a ténnyel, hogy az alsóbbrendű vízi élőlények is rendelkeznek β -receptorokkal [44], amelyekre hatással lehetnek ezek a gyógyszerek, még jelentősebbé válik ez a megfigyelés.

Az éves környezetterhelés-beccsléssel azt kívántam szemléltetni, hogy bár a nagy térfogatú Duna folyó mintázásakor csak kis koncentrációkat sikerült kimutatnom (ld. 20. táblázat), a két fő budai patak igen nagy mennyiségű szennyezést hoz magával évről-évre, ami beömlik a Dunába. Nagy valószínűséggel a hatalmas víztérfogat ezt kihigítja, illetve bizonyos mértékben ezek a komponensek le is ülepednek a vízben, vagy degradálódnak különböző környezeti hatásokra, de mégis figyelemreméltó szennyezést jelentenek a vízi élőlényekre nézve, ami komoly károkat is okozhat a különböző vízi populációkban. Ezért is lenne fontos megoldani a gyógyszer-maradékok eltávolítását a szennyvíztisztítás során, mielőtt a többé-kevésbé megtisztított vizet az élővizekbe engedik.

8. Összefoglalás

Doktori munkám során a 2006-os gyógyszereladási statisztika szerinti, hazánkban legnagyobb mennyiségben fogyasztott vényköteles gyógyszerek környezet-monitorozásával foglalkoztam. Vizsgálataim 26 célkomponense szívgyógyszerek, illetve gyomorsav-túltengést csökkentő gyógyszerek hatóanyagai voltak.

Munkám első fázisában kidolgoztam egy kellően gyors, érzékeny és megbízható szilárd-fázisú extrakciós (SPE) minta-előkészítésű LC-MS/MS módszert felszínvízminták vizsgálatára. A validálást követően hét – a téli hónapokban gyűjtött - Dunavízmintából összesen tizenkét komponenst sikerült detektálnom, melyek közül tizenegynek a mennyiségét is meg tudtam határozni. A mért átlag-koncentrációk 2 - 39 ng/l közöttiek voltak.

Munkám második fázisában predikciós módszereket dolgoztam ki a környezetben feltételezetten jelenlévő általam vizsgált hatóanyagok metabolitjainak kimutatására. Ehhez felhasználtam az anyavegyület fragmentációs tulajdonságait, illetve a biotranszformációs reakció során kialakuló szerkezeti- és molekulatömeg változásokat. A predikciós módszerrel felszíni vízmintából összesen huszonegy metabolitot azonosítottam, melyek közül hatot sikerült megerősítenem pontos tömegmérés segítségével.

Végül munkám harmadik fázisában, amely valójában folyamatosan zajlott, egy éves környezet-monitorozást hajtottam végre két budai patak vizsgálatával. A Budát észak felől határoló Aranyhegyi-patakot hat ponton, míg a délről határoló Hosszúréti-patakot öt ponton mintáztam három havonta, egy éven keresztül. Az évszakonkénti mintázással az időjárási viszonyok hatását vizsgáltam, de nem tapasztaltam azonos mintázatot a komponensek mennyiségének változásában. A mintavételi pontok megválasztása jól nyomomonkövethetővé tette a tisztító-telepek hozzájárulását a szennyezettséghez, akárcsak a mellék vízfolyások hígító hatását. Összességében megállapítható, hogy az Aranyhegyi-patak szennyezettebb a célkomponenseimre nézve.

Az éves környezetterhelés-becslés rávilágított arra, hogy bár igen kicsi – ng/l-es – koncentrációkat sikerült csak kimérnem a Dunavíz mintákból, mégis éves szinten kilogrammos mennyiségben jutnak ezek a komponensek a Dunába.

9. Summary

In my PhD work the most often prescribed drugs' residues – based on sales statistics in Hungary from 2006 – were monitored in environmental samples. Twenty-six cardiovascular and anti-ulcer agents were included.

As a first step a fast, sensitive and reliable solid-phase extraction (SPE) sample preparation based LC-MS/MS method was developed for the measurements. After validation the method was applied for assessment of Danube river water samples. Seven samples were collected in winter months. Twelve compounds could be detected whereof eleven could be quantified. The measured average concentrations ranged between 2 - 39 ng/L.

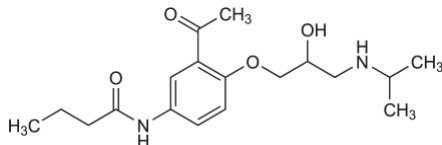
Thereafter I compiled predictive methods to target supposed metabolites of the investigated substances in environmental samples. These methods were based on the fragmentation pattern of the active substance and the structural and molecular weight alteration caused by the transformation reactions were used. This way twenty-one metabolites could be identified whereof six could be confirmed by accurate mass measurements.

Finally an environmental monitoring was carried out with the investigation of two streams in Buda. Aranyhegyi-stream was sampled at six points and Hosszúréti-stream at five points, in every three months during a year. With seasonal sampling the effect of weather conditions was investigated but no pattern in the variation of the compounds' concentrations could be observed. Spatial distribution of the sampling points enabled the detection of the effects of the nearby wastewater treatment plants and tributaries. On the whole Aranyhegyi-stream is much more polluted with the target compounds.

The annual environmental loading estimation showed that even though the measured concentrations from Danube river water samples were very low (in the range of ng/L) the quantity of these compounds reaching the Danube annually exceeds kilograms.

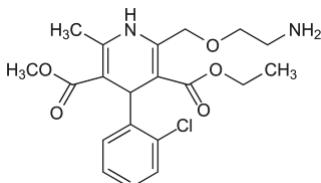
10. Függelék

10.1 A vizsgált komponensek szerkezeti képlete és hivatalos elnevezése



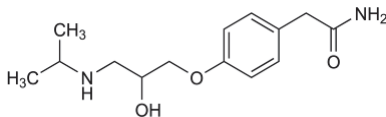
Acebutolol

N-[3-Acetyl-4-[2-hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propoxy]-butanamide



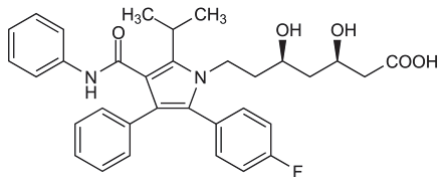
Amlodipin

2-[(2-Aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methyl-3,5-pyridinedicarboxylic acid 3-ethyl 5-methyl ester



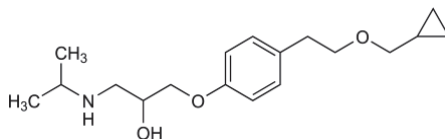
Atenolol

4-[2-Hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propoxy]benzeneacetamide



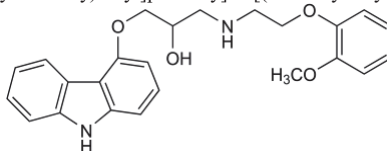
Atorvasztatin

[*R*'-(*R*'*)]-2-(4-Fluorophenyl)-β,δ-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-phenyl-4-[(phenylamino)carbonyl]-1*H*-pyrrole-1-heptanoic acid



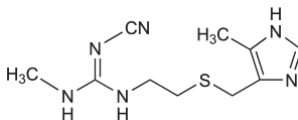
Betaxolol

1-[4-[2-(Cyclopropylmethoxy)ethyl]phenoxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-propanol



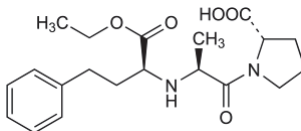
Carvedilol

1-(9*H*-Carbazol-4-yloxy)-3-[[2-(2-methoxyphenoxy)ethyl]amino]-2-propanol



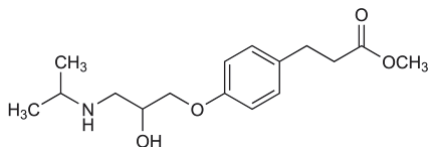
Cimetidin

N-Cyano-*N'*-methyl-*N''*-[2-[[[(5-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)methyl]thio]-ethyl]guanidine



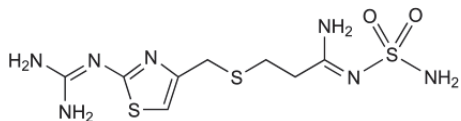
Enalapril

(*S*)-1-[*N*-[1-(Ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-L-alanyl]-L-proline



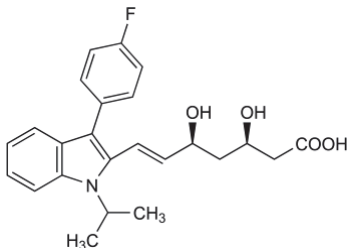
Esmolol

4-[2-Hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propoxy]benzenepropanoic acid methyl ester



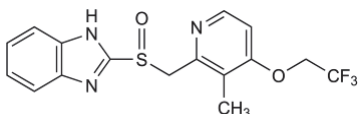
Famotidin

3-[[[2-[(Aminoiminomethyl)amino]-4-thiazolyl]methyl]thio]-*N*-(aminosulfonyl)propanimidamide



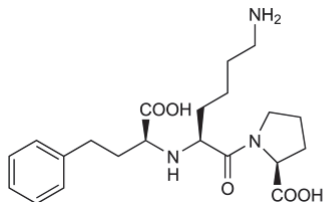
Fluvasztatin

(3*R*,5*S*,6*E*)-*rel*-7-[3-(4-Fluorophenyl)-1-(1-methylethyl)-1*H*-indol-2-yl]-3,5-dihydroxy-6-heptenoic acid



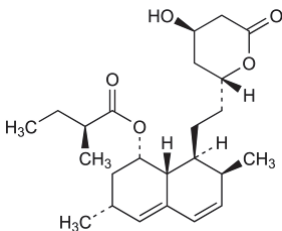
Lanzoprazol

2-[[[3-Methyl-4-(2,2,2-trifluoro-ethoxy)-2-pyridinyl]methyl]sulfinyl]-1*H*-benzimidazole



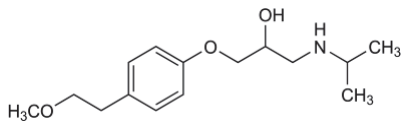
Lisinopril

(*S*)-1-[*N*^ε-(1-Carboxy-3-phenylpropyl)-L-lysyl]-L-proline



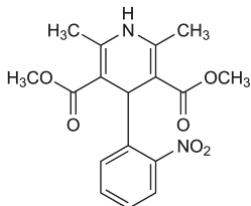
Lovasztatin

(2*S*)-2-Methylbutanoic acid (1*S*,3*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-1,2,3,7,8,8*a*-hexahydro-3,7-dimethyl-8-[2-[(2*R*,4*R*)-tetrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2*H*-pyran-2-yl]ethyl]-1-naphthalenyl ester



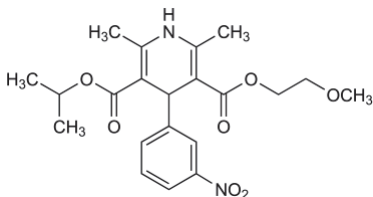
Metoprolol

1-[4-(2-Methoxyethyl)phenoxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-propanol



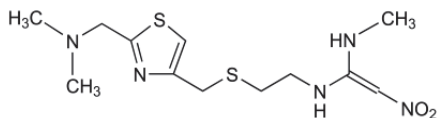
Nifedipin

Dimethyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)pyridine-3,5-dicarboxylate



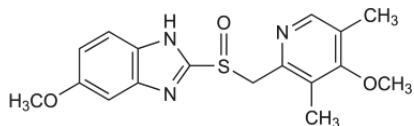
Nimodipin

1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylic acid 2-methoxyethyl-1-methylethyl ester



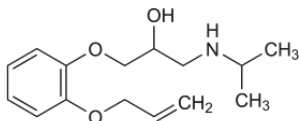
Nizatidin

N-[2-[[[2-[(Dimethylamino)methyl]-4-thiazolyl]methyl]thio]ethyl]-*N'*-methyl-2-nitro-1,1-ethenediamine



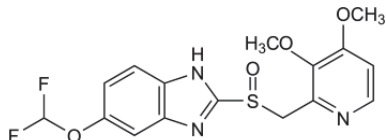
Omeprazol

5-Methoxy-2-[[[(4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridinyl)methyl]sulfinyl]-1*H*-benzimidazole



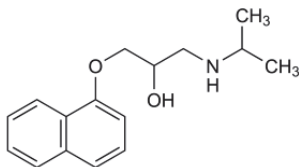
Oxprenolol

1-[(1-Methylethyl)amino]-3-[2-(2-propenyloxy)phenoxy]-2-propanol



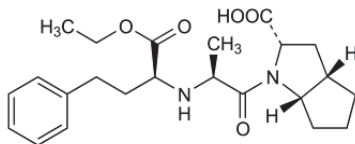
Pantoprazol

5-(Difluoromethoxy)-2-[[[(3,4-dimethoxy-2-pyridinyl)methyl]sulfinyl]-1*H*-benzimidazole



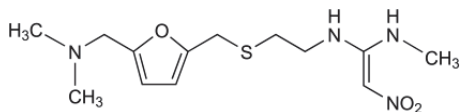
Propranolol

1-[(1-Methylethyl)amino]-3-(1-naphthalenyloxy)-2-propanol



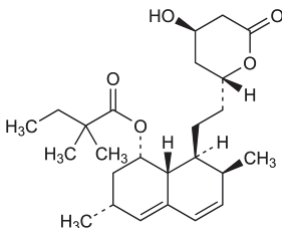
Ramipril

(2*S*,3*aS*,6*aS*)-1-[(2*S*)-2-[[[(1*S*)-1-(ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]amino]-1-oxopropyl]octahydrocyclopenta[*b*]pyrrole-2-carboxylic acid



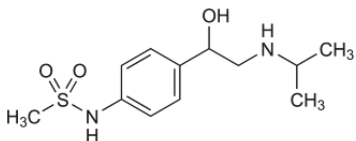
Ranitidin

N-[2-[[[5-[(Dimethylamino)methyl]-2-furanyl]methyl]thio]ethyl]-*N'*-methyl-2-nitro-1,1-ethenediamine



Szimvasztatin

2,2-Dimethylbutanoic acid (1*S*,3*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-1,2,3,7,8,8*a*-hexahydro-3,7-dimethyl-8-[2-[(2*R*,4*R*)-tetrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2*H*-pyran-2-yl]ethyl]-1-naphthalenyl ester



Sotalol

N-[4-[1-Hydroxy-2-[(1-methylethyl)amino]ethyl]phenyl]-methanesulfonamide

10.2 A szilika alapú SPE patronokon alkalmazott minta-előkészítési eljárások

Patronok	SampliQ Si-SCX (500mg,6ml)	SampliQ C18 (150mg,6ml)	SampliQ C18-EC (150mg,6ml)	Isolute DSC-SCX (200mg,6ml)	Isolute DSC-WCX (200mg,6ml)	Isolute Multimode (300mg,3ml)	SPEC SPX (35mg,10ml)
Kondicionálás	5ml MeOH	2x3 ml MeOH	2x3ml MeOH	5ml MeOH	5ml MeOH	3ml MeOH	5ml MeOH
Ekvibrálás	5ml MQ víz ^a , pH=minta pH ^b	2x3ml MQ víz	2x3ml MQ víz	5ml 2% HCOOH/ MQ víz	5ml 2% HCOOH/ MQ víz	3ml MQ víz	5ml 0,4% CH ₃ COOH
Mintatérfogat	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml +500µl HCOOH	100 ml +500µl HCOOH	100 ml	100 ml
Felviteli sebesség	~4ml/perc	~1ml/perc	~1ml/perc	~2,5ml/perc	~5ml/perc	~2ml/perc	~ 3ml/perc
Mosás	-	3ml MQ víz	3ml MQ víz	5ml 2% HCOOH/ MQ víz	5ml 2% HCOOH/ MQ víz	-	5ml 1:1 MeOH/ACN
Száritás	2 perc	10 perc	10 perc	2 perc	2 perc	2 perc	1 perc
Elúció	2,5ml MeOH + 2,5ml 1:1 NH ₃ - old./MeOH	3ml MeOH + 3ml IPA	3ml MeOH + 3ml IPA	5ml 5% NH ₃ - old./ MeOH	5ml 5% NH ₃ - old./ MeOH	3ml MeOH	5ml 98:2 MeOH/ NH ₃ -old.
Bepárlás	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)
Visszaoldás	1 ml 10% MeOH/ MQ víz	1 ml 10% MeOH/ MQ víz	1 ml 10% MeOH/ MQ víz	1 ml 10% MeOH/ MQ víz	1 ml 10% MeOH/ MQ víz	1 ml 10% MeOH/ MQ víz	1 ml 10% MeOH/ MQ víz

a: „MQ víz” – ioncserélt víz

b: „pH=minta pH” – az ioncserélt víz pH-ját a minta pH-jával megegyező értékre állítottam

c: „NH₃-old.” – 25%-os ammónia-oldat

10.3 A polimer alapú patronokon alkalmazott minta-előkészítési eljárások

Patronok	SampliQ Polimer-SCX (150mg,6ml)	Oasis HLB (60mg,3cc)	Oasis HLB (500mg,12cc) ¹	Oasis HLB (500mg,12cc) ²	Isolute ENV+ (200mg,6ml)	Bond Elut Plexa PCX (500mg,6ml)
Lépések						
Kondicionálás	5ml MeOH	3ml MeOH	5ml MeOH	5ml n-hexán 5ml aceton 10ml MeOH	5ml MeOH	5ml MeOH
Ekvibrálás	5ml MQ víz ^a , pH=minta pH ^b	3ml MQ víz	5ml MQ víz	10ml MQ víz, pH=minta pH	5ml MQ víz	5ml MQ víz
Mintatérfogat	100 ml	100 ml	100 ml	500ml	100 ml	100 ml
Felviteli sebesség	~2ml/perc	~3ml/perc	~3ml/perc	~4ml/perc	~4ml/perc	~3ml/perc
Mosás	5ml MQ víz, pH=minta pH	-	5ml MQ víz	2ml 5% MeOH 2% NH ₃ -old. ^c - ban	-	2ml 2% HCOOH + 2ml 1:1 MeOH/ACN
Száritás	5 perc	10 perc	5 perc	10 perc	3 perc	5 perc
Elúció	2,5ml MeOH + 2,5ml 1:1 NH ₃ - old./MeOH	3ml MeOH	5ml MeOH	5ml MeOH	5ml MeOH	5% NH ₃ -old. MeOH/ACN 1:1 elegyében
Bepárlás	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)	szárazra (N ₂)
Visszaoldás	1 ml 10% MeOH/ MQ víz	1 ml 10% MeOH/ MQ víz	1 ml 10% MeOH/ MQ víz	1 ml 10% MeOH/ MQ víz	1 ml 10% MeOH/ MQ víz	1 ml 10% MeOH/ MQ víz

1: a gyártó által javasolt eljárás

2: Vieno és munkatársai által is alkalmazott metodikán alapuló eljárás [146]

a: „MQ víz” – ioncserélt víz

b: „pH=minta pH” – az ioncserélt víz pH-ját a minta pH-jával megegyező értékre állítottam

c: „NH₃-old.” – 25%-os ammónia-oldat

10.4 Az extrahált ionkromatogramokhoz felhasznált pontos tömeg értékek

Név	Képlet	Tömeg	Protonált tömeg	Pontos tömeg	Protonáltan
AMLODIPIN	C ₂₀ H ₂₅ ClN ₂ O ₅	408,879	409,1	408,1452	409,1525
	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O ₅		393	392,1139	393,1212
	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂ O ₅		395	394,1295	395,1368
	C ₁₉ H ₁₉ ClNO ₈		425 / 425,1	424,0799	425,0872
	C ₂₀ H ₂₁ ClNO ₇		423 / 423,1	422,1007	423,1079
	C ₂₂ H ₂₅ ClN ₂ O ₆		449	448,1401	449,1474
	C ₂₂ H ₂₆ ClN ₂ O ₆		451	449,1479	450,1552
	C ₂₀ H ₂₄ ClN ₂ O ₅		408,1	407,1374	408,1447
	C ₁₉ H ₂₂ ClN ₂ O ₅		394,1	393,1217	394,129
	C ₁₈ H ₁₇ ClNO ₆		380,1	378,0744	379,0817
	C ₁₈ H ₁₉ ClNO ₅		365,1	364,0952	365,1025
	C ₁₈ H ₁₈ ClNO ₅		364,1	363,0874	364,0946
	C ₁₆ H ₁₄ ClNO ₅		337,1	335,0561	336,0633
	C ₁₉ H ₁₉ ClNO ₇		409,1	408,085	409,0923
	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₄		337,1	336,2049	337,2122
	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O ₄		309,1	308,1736	309,1809
ACEBUTOLOL	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	266,336	267,1	266,163	267,1703
Diacetolol	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₄		283,1	282,158	283,1652
ATENOLOL	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅	558,64	559,4	558,253	559,2603
Hidroxil~	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₆		575,4	574,2479	575,2552
ATORVASZTATIN	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₇	307,428	591,4	590,2428	591,2501
Dihidroxil~	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃		308,1	307,2147	308,222
BETAXOLOL	C ₁₈ H ₂₉ NO ₄	406,474	324,1	323,2097	324,2169
Hidroxil~	C ₁₄ H ₂₁ NO ₄		277,1	267,1471	268,1543
Savszármazék	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	406,474	407,1	406,1893	407,1965
CARVEDILOL	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₄		393	392,1736	393,1809
Dezmetil~	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₅	252,34	423	422,1842	423,1914
Hidroxil~	C ₁₂ H ₁₉ NO ₄		242	241,1314	242,1387
Dezcarbazonil	C ₁₁ H ₁₇ NO ₄	252,34	228	227,1158	228,123
Dezmetildezcarbazonil	C ₁₀ H ₁₆ N ₆ S		253,1	252,1157	253,123
CIMETIDIN	C ₁₀ H ₁₆ N ₆ SO	376,447	269,1	268,1106	269,1179
Szulfoxid/hidroximetil	C ₁₀ H ₁₈ N ₆ SO		271,1	270,1263	271,1336
ENALAPRIL	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	295,374	377,2	376,1998	377,2071
Enalaprilát	C ₁₆ H ₂₅ NO ₄		349,2	348,1685	349,1758
ESMOLOL	C ₁₅ H ₂₃ NO ₄	337,449	296,1	295,1784	296,1856
Dezmetil	C ₈ H ₁₅ N ₇ O ₂ S ₃		282,1	281,1627	282,17
FAMOTIDIN	C ₈ H ₁₅ N ₇ O ₂ S ₃	411,466	338,1	337,0449	338,0522
Szulfoxid	C ₂₄ H ₂₆ FNO ₄		354,1	353,0398	354,0471
FLUVASZTATIN	C ₁₈ H ₁₅ FNO ₂	370,2	412,2	411,1846	412,1919
Dezizopropilpropionsav	C ₂₁ H ₂₀ FNO ₄		336,2	296,1087	297,116
Dezizopropil	C ₂₄ H ₂₆ FNO ₅	428,2	370,2	369,1376	370,1449
Hidroxil~			428,2	427,1795	428,1868

Név	Képlet	Tömeg	Protonált tömeg	Pontos tömeg	Protonáltan
LANSOPRAZOL	$C_{16}H_{14}F_3N_3O_2S$	369,363	370,1	369,0759	370,0832
Szulfon/hidroxil- szulfínil	$C_{16}H_{14}F_3N_3O_3S$		386,1	385,0708	386,0781
Szulfid	$C_{16}H_{14}F_3N_3OS$		354,1	353,081	354,0882
Hidroxil-szulfon	$C_{16}H_{14}F_3N_3O_4S$		402,1	401,0657	402,073
Hidroxil-szulfid	$C_{16}H_{14}F_3N_3O_2S$		370,1	369,0759	370,0832
LISINOPRIL	$C_{21}H_{31}N_3O_5$	405,488	406,3	405,2264	406,2336
LOVASZTATIN	$C_{24}H_{36}O_5$	404,54	405,3	404,2563	405,2636
Hidroxil~	$C_{24}H_{36}O_6$		421,3	420,2512	421,2585
Exometilén~	$C_{24}H_{34}O_5$		403,3	402,2406	403,2479
METOPROLOL	$C_{15}H_{25}NO_3$	267,364	268,2	267,1834	268,1907
Hidroxil~	$C_{15}H_{25}NO_4$		284,2	283,1784	284,1856
Dezmetil-hidroxil	$C_{14}H_{23}NO_4$		270,2	269,1627	270,17
Dezmetil	$C_{14}H_{23}NO_3$		254,2	253,1678	254,1751
	$C_{13}H_{21}NO_3$		240,2	239,1521	240,1594
NIFEDIPIN	$C_{17}H_{18}N_2O_6$	346,335	347,1	346,1165	347,1238
Dehidro~	$C_{17}H_{16}N_2O_6$		345,1	344,1008	345,1081
Hidroximetil	$C_{17}H_{18}N_2O_7$		363,1	362,1114	363,1187
NIMODIPIN	$C_{21}H_{26}N_2O_7$	418,44	419,2	418,174	419,1813
NIZATIDIN	$C_{12}H_{21}N_5O_5S_2$	331,46	332,1	331,1137	332,1209
Szulfoxid	$C_{12}H_{21}N_5O_5S_2$		348,1	347,1086	348,1159
OMEPRAZOL	$C_{17}H_{19}N_3O_3S$	345,4	346,1	345,1147	346,122
Hidroxil~/szulfon	$C_{17}H_{19}N_3O_4S$		362,1	361,1096	362,1169
Hidroxiszulfon	$C_{17}H_{19}N_3O_3S$		378,1	377,1045	378,1118
Szulfid	$C_{17}H_{19}N_3O_2S$		330,1	329,1198	330,1271
OXPRENOLOL	$C_{15}H_{23}NO_3$	265,348	266,1	265,1678	266,1751
Dezizopropil	$C_{12}H_{17}NO_3$		224,1	223,1208	224,1281
Dezallil	$C_{12}H_{19}NO_3$		226,1	225,1365	226,1438
Hidroxil	$C_{15}H_{23}NO_4$		282,1	281,1627	282,17
	$C_{12}H_{14}O_5$		239,1	238,0841	239,0914
	$C_{11}H_{12}O_4$		195,1	208,0736	209,0808
	$C_8H_8O_4$		155,1	168,0423	169,0495
Glikol	$C_{12}H_{16}O_4$		225,1	224,1049	225,1121
Metilamino	$C_{13}H_{19}NO_3$		238,1	237,1365	238,1438
PANTOPRAZOL	$C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$	383,371	384,2	383,0751	384,0824
Hidroxil	$C_{15}H_{13}F_2N_3O_4S$		370,2	369,0595	370,0668
Szulfon	$C_{16}H_{15}F_2N_3O_5S$		400,2	399,07	400,0773
Szulfid	$C_{16}H_{15}F_2N_3O_3S$		368,2	367,0802	368,0875
PROPRANOLOL	$C_{16}H_{21}NO_2$	259,34	260,1	259,1572	260,1645
Hidroxil~	$C_{16}H_{21}NO_3$		276,1	275,1521	276,1594
RAMIPRIL	$C_{23}H_{32}N_2O_5$	416,511	417,3	416,2311	417,2384
Ramiprilát	$C_{21}H_{29}N_2O_5$		389,3	389,2076	390,2149

Név	Képlet	Tömeg	Protonált tömeg	Pontos tömeg	Protonáltan
RANITIDIN	$C_{13}H_{22}N_4O_3S$	314,4	315,2	314,1413	315,1485
N-oxid/S-oxid	$C_{13}H_{22}N_4O_4S$		331,2	330,1362	331,1435
SZIMVASZTATIN	$C_{25}H_{38}O_5$	418,566	419,3	418,2719	419,2792
Hidroximetil	$C_{25}H_{38}O_6$		435,3	434,2668	435,2741
Karboxil	$C_{25}H_{36}O_7$		449,3	448,2461	449,2534
Exometilén	$C_{25}H_{36}O_5$		417,3	416,2563	417,2636
SOTALOL	$C_{12}H_{20}N_2O_3S$	272,3624	273,1	272,1195	273,1267

11. Irodalomjegyzék

- [1] A háziorvoshoz bejelentkezett 19 éves és idősebbek főbb betegségei (fő), 1999-2007, www.ksh.hu / Adatok / Témakörök / Egészségügy, baleset / Megbetegedések, balesetek / Felnőttek betegségei.
- [2] Háziorvosokhoz és házi gyermekorvosokhoz bejelentkezett 0-18 éves korúak főbb betegségei (fő), 1999-2007, www.ksh.hu / Adatok / Témakörök / Egészségügy, baleset / Megbetegedések, balesetek / Gyermekek betegségei.
- [3] Megugrott a gyógyszerkiadás, 2009, Gyógyszerpiac, www.weborvos.hu
- [4] Egyre többet költünk receptköteles gyógyszerekre, 2008, Gyógyszerpiac, www.weborvos.hu
- [5] A legnagyobb forgalmú gyógyszerek Magyarországon (2006), IMS Health, Marketing Pirula, 2007, <http://www.euuzlet.hu/tablazatok/gyogyszerek.html>
- [6] Barótfi István: Környezettechnika, 2000, Mezőgazda Kiadó.
- [7] Vermes László: Vízgazdálkodás – mezőgazdasági, kertész-, tájépítés- és erdőmérnök-hallgatók részére, 1997, Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó.
- [8] Steroid hormones as water pollutants I. Metabolism of natural and synthetic ovulation inhibiting hormones by micro-organisms of activated sludge and primary settled sludge, H. H. Tabak, R. L. Brunch, Develop. Ind. Microbiol., 11 (1970) 367-376.
- [9] Untersuchungen zur Frage der Löslichkeit und Stabilität ovulationshemmender Steroide in Wasser, Abwässern und Beliebschlamm, K. Norpoth, A. Nehrkorn, M. Kirchner, H. Holsen, H. Teipel, Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. I. Abt. Orig. B, 156 (1973) 500-511.
- [10] Analysis of organic compounds in domestic wastewater, A. W. Garrison, J. D. Pope, F. R. Allen, Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water, Keith C. H. (Ed.), 1976, Ann Arbor Science, Michigan, USA.
- [11] The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment, M. L. Richardson, J. M. Bowron, J. Pharm. Pharmacol., 37 (1985) 1-12.
- [12] Water-quality reconnaissance of the perimeter of the Rolling Knoll landfill near Green Village, New Jersey, and electromagnetic survey of the parts of the landfill within the Great Swamp National Wildlife Refuge, 1989, K. S. Turner, M. A. Hardy, R. J. Tapper, US Geological Survey Open-File Rep., 1993, 92-153.

- [13] Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill, Grindsted, Denmark, J. V. Holm, K. Rugge, P. L. Bjerg, T. H. Christensen, *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 1415-1420.
- [14] Determination of clofibric acid and N-(Phenylsulfonyl)-Sarcosine in sewage, river and drinking water, T. H. Heberer, H. J. Stan, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 67 (1997) 113-124.
- [15] Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide mecoprop in various Swiss lakes and in the North Sea, H. R. Buser, M. D. Muller, N. Theobald, *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 188-192.
- [16] Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake, H. R. Buser, T. Poiger, M. D. Muller, *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 3449-3456.
- [17] Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater, H. R. Buser, T. Poiger, M. D. Muller, *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999) 2529-2535.
- [18] Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and alpha2-sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS, T. Ternes, R. Hirsch, J. Mueller, K. Haberer, *Fresen. J. Anal. Chem.*, 362 (1998) 329-340.
- [19] Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review, B. Halling-Sorensen, S. Nors Nielsen, P. F. Lanzky, F. Ingerslev, H. C. Holten Luthoft, S. E. Jorgensen, *Chemosphere*, 36 (1998) 357-393.
- [20] Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil, T. A. Ternes, M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R.-D. Wilken, M. Servos, *Sci. Total Environ.*, 225 (1999) 81-90.
- [21] Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic acids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review, K. Kümmerer, *Chemosphere*, 45 (2001) 957-969.
- [22] Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999-2000: a national reconnaissance, D. W. Kolpin, E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber, H. T. Buxton, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2001) 1202-1211.

- [23] Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, T. Heberer, *Toxicol. Lett.*, 131 (2002) 5-17.
- [24] Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy, D. Calamari, E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 1241-1248.
- [25] Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions, D. W. Kolpin, M. Skopec, M. T. Meyer, E. T. Furlong, S. D. Zaugg, *Sci. Total Environ.*, 328 (2004) 119-130.
- [26] Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant, P. E. Stackelberg, E. T. Furlong, M. T. Meyer, S. D. Zaugg, A. K. Henderson, D. B. Reissman, *Sci. Total Environ.*, 329 (2004) 99-113.
- [27] Pharmaceuticals in wastewater: Behavior, preferences, and willingness to pay for a disposal program, M. Kotchen, J. Kallaos, K. Wheeler, C. Wong, M. Zahller, J. Environ. Management, 90 (2009) 1476-1482.
- [28] Polar drugs in sewage and natural waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil, M. Stumpf, T. A. Ternes, R. D. Wilken, S. V. Rodrigues, W. Baumann, *Sci. Total Environ.*, 225 (1999) 135-141.
- [29] Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water, T. Heberer, *J. Hydrol.*, 266 (2002) 175-189.
- [30] Removal of pharmaceutical residues during wastewater treatment, J. E. Drewes, *Compr. Anal. Chem.*, 50 (2007) 427-449.
- [31] Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment, J. Radjenović, M. Petrović, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 1132-1144.
- [32] The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters, B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, *Water Res.*, 43 (2009) 363-380.
- [33] Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment, J. Radjenović, M. Petrović, D. Barceló, *Water Res.*, 43 (2009) 831-841.

- [34] Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor, J. Radjenović, M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 1365-1377.
- [35] Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, F. Pomati, D. Calamari, E. Zuccato, *Environ. Sci. Technol.*, 40 (2006) 357-363.
- [36] Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment, A. Joss, E. Keller, A. C. Alder, A. Göbel, C. S. McArdell, T. Ternes, H. Siegrist, *Water Res.*, 39 (2005) 3139-3152.
- [37] Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme, A. Joss, S. Zabczynski, A. Göbel, B. Hoffmann, D. Löffler, C. S. McArdell, T. A. Ternes, A. Thomsen, H. Siegrist, *Water Res.*, 40 (2006) 1686-1696.
- [38] Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, T. A. Ternes, *Water Res.*, 32 (1998) 3245-3260.
- [39] Persistence of drugs occurring in liquid manure in the food chain, K. Berger, B. Petersen, H. Buening-Pfaue, *Archiv fuer Lebensmittelhygiene*, 37 (1986) 99-102.
- [40] Untersuchungen zum Abbau von Pharmaka in Kommunalen Kläranlagen mit HPLC – Electrospray – Massenspektrometrie, E. Möehle, C. Kempter, A. Kern, J. W. Metzger, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 27 (1999) 430-436.
- [41] Transformation of a non-oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity, G. H. Panter, R. S. Thompson, N. Beresford, J. P. Sumpter, *Chemosphere*, 38 (1999) 3579-3596.
- [42] Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Mancini, R. Mastropasqua, M. Nazzari, R. Samperi, *Sci. Total Environ.*, 302 (2003) 199-209.
- [43] Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water, S. Mompelat, B. LeBot, O. Thomas, *Environ. Int.*, 35 (2009) 803-814.
- [44] Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment, M. Farré, S. Pérez, L. Kantiani, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.*, 27 (2008) 991-1007.

- [45] Sources and transport of selected organic micropollutants in urban groundwater underlying the city of Halle (Saale), Germany, K. Osenbrück, H. R. Gläser, K. Knöller, S. M. Weise, M. Möder, R. Wennrich, M. Schirmer, F. Reinstorf, W. Busch, G. Strauch, *Water Res.*, 41 (2007) 3259-3270.
- [46] Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry, S. K. Khetan, T. J. Collins, *Chem. Rev.*, 107 (2007) 2319-2364.
- [47] Ecopharmacology: deliberated or casual dispersion of pharmaceutical principles, phytosanitary, personal health care and veterinary products in environment needs a multivariate analysis or expert systems for the control, the measure and the remediation, M. P. Sammartino, F. Bellanti, M. Castrucci, D. Rui, G. Visco, T. Zoccarato, *Microchem. J.*, 88 (2008) 201-209.
- [48] Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, A. Nikolau, S. Meric, D. Fatta, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 1225-1234.
- [49] LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment, M. Petrović, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 486-493.
- [50] Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: a review, A. L. Boreen, W. A. Arnold, K. McNeill, *Aquat. Sci.*, 65 (2003) 320-341.
- [51] Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas, *Chemosphere*, 50 (2003) 1319-1330.
- [52] Unexpected products and reaction mechanisms of the aqueous chlorination of cimetidine, J. M. Buth, W. A. Arnold, K. McNeill, *Environ. Sci. Technol.*, 41 (2007) 6228-6233.
- [53] Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan, J. L. Oaks, M. Gilbert, M. Z. Virani, R. T. Watson, C. U. Meteyer, B. A. Rideout, H. L. Shivaprasad, S. Ahmed, M. J. I. Chaudhry, M. Arshad, S. Mahmood, A. Ali, A. A. Khan, *Nature*, 427 (2004) 630-633.
- [54] Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen, K. A. Kidd, P. J. Blanchfield, K. H. Mills, V. P. Palace, R. E. Evans, J. M. Lazorchak, R. W. Flick, *PNAS*, 104 (2007) 8897-8901.
- [55] Ecotoxicology of human pharmaceuticals, K. Fent, A. A. Weston, D. Caminada, *Aquatic Toxicology*, 76 (2006) 122-159.

- [56] Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water, S. Webb, T. Ternes, M. Gibert, K. Olejniczak, *Toxicol. Lett.*, 142 (2003) 157-167.
- [57] Occurrence of polar organic contaminants in Berlin drinking water, T. Heberer, H. J. Stan, *Vom. Wasser*, 86 (1996) 19-31.
- [58] Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata, Kremmer Tibor, Torkos Kornél, 2010, Akadémiai Kiadó.
- [59] Mass Spectrometry, Principles and Applications, 3rd edition, Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant, 2007, John Wiley & Sons, Ltd.
- [60] Suitability of *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and *N*-(tert-butyl)dimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography – mass spectrometry, A. Shareef, C. J. Parnis, M. J. Angove, J. D. Wells, B. B. Johnson, *J. Chromatogr. A*, 1026 (2004) 295-300.
- [61] Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography – mass spectrometry, Z. L. Zhang, A. Hibberd, J. L. Zhou, *Anal. Chim. Acta*, 577 (2006) 52-61.
- [62] GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices, C. Hao, X. Zhao, P. Yang, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 569-580.
- [63] Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography – negative chemical ionization mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives, X. Xiao, D. V. McCalley, J. McEvoy, *J. Chromatogr. A*, 923 (2001) 195-204.
- [64] Quantitation of estrogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction, pentafluorobenzil/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography – negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry, D. D. Fine, G. P. Breidenbach, T. L. Price, S. R. Hutchins, *J. Chromatogr. A*, 1017 (2003) 167-185.
- [65] New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography – mass spectrometry, S. Weigel, K. Bester, H. Hühnerfuss, *J. Chromatogr. A*, 912 (2001) 151-161.

- [66] Pharmaceuticals in groundwaters, Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany, F. Sacher, F. T. Lange, H. Brauch, I. Blankenhorn, *J. Chromatogr. A*, 938 (2001) 199-210.
- [67] Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites, S. Weigel, U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Hühnerfuss, *Chemosphere*, 56 (2004) 583-592.
- [68] Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom, D. Ashton, M. Hilton, K. V. Thomas, *Sci. Total Environ.*, 333 (2004) 167-184.
- [69] Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction – gas chromatography – mass spectrometry, R. Liu, J. L. Zhou, A. Wilding, *J. Chromatogr. A*, 1022 (2004) 179-189.
- [70] Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant in the recipient water, N. M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, *Environ. Sci. Technol.*, 39 (2005) 8220-8226.
- [71] Multiresidue analysis of pollutants as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography – mass spectrometry, Á. Sebők, A. Vasanits-Zsigrai, A. Helenkár, Gy. Záray, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 2288-2301.
- [72] The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography – mass spectrometry, A. Helenkár, Á. Sebők, Gy. Záray, I. Molnár-Perl, A. Vasanits-Zsigrai, *Talanta*, 82 (2010) 600-607.
- [73] Investigation of acidic pharmaceuticals in river water and sediment by microwave-assisted extraction and gas chromatography – mass spectrometry, M. Varga, J. Dobor, A. Helenkár, L. Jurecska, J. Yao, Gy. Záray, *Microchem. J.*, 95 (2010) 353-358.
- [74] Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on, D. Barceló, M. Petrović, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 2-11.
- [75] Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples, T. A. Ternes, *Trends Anal. Chem.*, 20 (2001) 419-434.
- [76] Development of a hydrophilic interaction chromatography – mass spectrometry assay for spectinomycin and lincomycin in liquid hog manure supernatant and run-off from

cropland, K. M. Peru, S. L. Kuchta, J. V. Headley, A. J. Cessna, J. Chromatogr. A, 1107 (2006) 152-158.

[77] UPLC/MS for the identification of β -blockers, S. A. C. Wren, P. Tchelitcheff, J. Pharm. Biomed. Anal., 40 (2006) 571-580.

[78] Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography – positive electrospray ionization tandem mass spectrometry, B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, J. Chromatogr. A, 1161 (2007) 132-145.

[79] Rapid liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water, J. M. Conley, S. J. Symes, S. A. Kindelberger, S. M. Richards, J. Chromatogr. A, 1185 (2008) 206-215.

[80] Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry, B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, Anal. Bioanal. Chem., 391 (2008) 1293-1308.

[81] Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS, A. L. Batt, M. S. Kostich, J. M. Lazorchak, Anal. Chem., 80 (2008) 5021-5030.

[82] Serial mixed-mode cation- and anion-exchange solid-phase extraction for separation of basic, neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater and analysis by high-performance liquid chromatography – quadrupole time-of-flight mass spectrometry, M. Lavén, T. Alsberg, Y. Yu, M. Adolfsson-Erici, H. Sun, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 49-62.

[83] Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography – tandem mass spectrometry, E. Gracia-Lor, J. V. Sancho, F. Hernández, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 622-632.

[84] Trace analysis of antidepressants in environmental waters by molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry, K. Demeestere, M.

Petrović, M. Gros, J. Dewulf, H. Van Langenhove, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010) 825-837.

[85] Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, B. J. Vanderford, R. A. Pearson, D. J. Rexing, S. A. Snyder, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6265-6274.

[86] Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry, W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A*, 910 (2001) 69-78.

[87] Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry, R. N. Rao, N. Venkateswarlu, R. Narsimha, *J. Chromatogr. A*, 1187 (2008) 151-164.

[88] Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater, D. Fatta, A. Nikolaou, A. Achilleos, S. Meriç, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 515-533.

[89] Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography – mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio Fischeri*, M. la Farré, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivella, L. Tirapu, M. Vilanova, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 938 (2001) 187-197.

[90] Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry, J. D. Cahill, E. T. Furlong, M. R. Burkhardt, D. Kolpin, L. G. Anderson, *J. Chromatogr. A*, 1041 (2004) 171-180.

[91] Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination, A. L. Batt, D. S. Aga, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2940-2947.

[92] Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA, A. L. Batt, D. D. Snow, D. S. Aga, *Chemosphere* 64 (2006) 1963-1971.

[93] High-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument, J. W. Hager, J. C. Yves Le Blanc, *J. Chromatogr. A*, 1020 (2003) 3-9.

- [94] Stereoisomer quantification of the β -blocker drugs atenolol, metoprolol, and propranolol in wastewaters by chiral high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry, L. N. Nikolai, E. L. McClure, S. L. MacLeod, C. S. Wong, J. Chromatogr. A, 1131 (2006) 103-109.
- [95] Trace level determination of β -blockers in waste waters by highly selective molecularly imprinted polymers extraction followed by liquid chromatography – quadrupole-linear ion trap mass spectrometry, M. Gros, T. Pizzolato, M. Petrović, M. J. L. de Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 1189 (2008) 374-384.
- [96] Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching, M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, Anal. Chem. 81 (2009) 898-912.
- [97] Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography – ion trap – tandem mass spectrometry, S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 4989-5000.
- [98] Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry, C. Wang, H. Shi, C. D. Adams, S. Gamagedara, I. Stayton, T. Timmons, Y. Ma, Water Res., 45 (2011) 1818-1828.
- [99] Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography – quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, M. Petrović, M. Gros, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 1124 (2006) 68-81.
- [100] Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water, A. A. M. Stolker, W. Niesing, E. A. Hogendoorn, J. F. M. Versteegh, R. Fuchs, U. A. Th. Brinkman, Anal. Bioanal. Chem., 378 (2004) 955-963.
- [101] Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry, O. J. Pozo, C. Guerrero, J. V. Sancho, M. Ibáñez, E. Pitarch, E. Hogendoorn, F. Hernández, J. Chromatogr. A, 1103 (2006) 83-93.

- [102] Comparison of the analysis of β -blockers by different techniques, E. Pujos, C. Cren-Olivé, O. Paisse, M. M. Flament-Waton, M. F. Grenier-Loustalot, J. Chromatogr. B, 877 (2009) 4007-4014.
- [103] Non-target screening analysis of river water as compound-related base for monitoring measures, J. Schwarzbauer, M. Ricking, Environ. Sci. Pollut. Res., 17 (2010) 934-947.
- [104] Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography – tandem mass spectrometry, Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters, K. Stoob, H. P. Singer, C. W. Goetz, M. Ruff, S. R. Mueller, J. Chromatogr. A, 1097 (2005) 138-147.
- [105] Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti-inflammatory drugs in water samples, I. Rodríguez, J. Carpinteiro, J. B. Quintana, A. M. Carro, R. A. Lorenzo, R. Cela, J. Chromatogr. A, 1024 (2004) 1-8.
- [106] Polymer-coated hollow-fiber microextraction of estrogens in water samples with analysis by gas chromatography – mass spectrometry, C. Basheer, A. Jayaraman, M. K. Kee, S. Valiyaveetil, H. K. Lee, J. Chromatogr. A, 1100 (2005) 137-143.
- [107] Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in wastewaters by dual solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry, N. Unceta, M. C. Sampedro, N. K. A. Bakar, A. Gómez-Caballero, M. A. Goicolea, R. J. Barrio, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 3392-3399.
- [108] Pharmindex Zsebkönyv, Dr. Biró Orsolya, Dr. Elek Csaba, Dr. Székely Gábor, Batta Ildikó, 2006, CMPMedica Információs Kft., Budapest.
- [109] Gyógyszerkémia I., Tőke László, Szeghy Lajos, 1992, Tankönyvkiadó, Budapest.
- [110] Hatóanyagok, készítmények, terápia, Borvendég János, Váradi András, 2002, Melinda Kiadó és Reklámügynökség, Budapest.
- [111] Determination of betaxolol and its metabolites in blood and urine by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection, Y. W. Wong, T. M. Ludden, J. Chromatogr., 534 (1990) 161-172.
- [112] Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: Are the statins mechanistically similar?, U. Christians, W. Jacobsen, L. C. Floren, Pharmacol. Ther., 80 (1998) 1-34.

- [113] Metabolism of carvedilol in dogs, rats, and mice, W. H. Schaefer, J. Politowski, B. Hwang, F. Dixon Jr., A. Goalwin, L. Gutzait, K. Anderson, C. Debrosse, M. Bean, G. R. Rhodes, *Drug Metab. Dispos.*, 26 (1998) 958-969.
- [114] Metabolism of carvedilol in man, G. Neugebauer, P. Neubert, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 16 (1991) 257-260.
- [115] In vivo biotransformation of metoprolol in the horse and on-column esterification of the aminocarboxylic acid metabolite by alcohols during solid phase extraction using mixed mode columns, M. C. Dumasia, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40 (2006) 75-81.
- [116] Enalapril: pharmacokinetic/dynamic inferences for comparative developmental toxicity. A review, S. A. Tabacova, C. A. Kimmel, *Reprod. Toxicol.*, 15 (2001) 467-478.
- [117] Liquid chromatography – mass spectrometry method for determination of ramipril and its active metabolite ramiprilat in human plasma, Z. Zhu, A. Vachareau, L. Neirinck, *J. Chromatogr. B*, 779 (2002) 297-306.
- [118] Determination of cimetidine in human plasma by free capillary zone electrophoresis, J. Lukša, Dj. Josić, *J. Chromatogr. B*, 667 (1995) 321-327.
- [119] Validation of a simplified method for determination of cimetidine in human plasma and urine by liquid chromatography with ultraviolet detection, T. Iqbal, C. S. Karyekar, M. Kinjo, G. C. Ngan, T. C. Dowling, *J. Chromatogr. B*, 799 (2004) 337-341.
- [120] Determination of lansoprazole and five metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography, M. D. Karol, G. R. Granneman, K. Alexander, *J. Chromatogr. B*, 668 (1995) 182-186.
- [121] Interaction of proton pump inhibitors with cytochromes P450: consequences for drug interactions, U. A. Meyer, *Yale J. Biol. Med.*, 69 (1996) 203-209.
- [122] Characterization of the in vitro metabolic profile of amlodipine in rat using liquid chromatography – mass spectrometry, B. Suchanova, R. Kostianen, R. A. Ketola, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 33 (2008) 91-99.
- [123] Using supported liquid extraction together with cellobiohydrolase chiral stationary phases-based liquid chromatography with tandem mass spectrometry for enantioselective determination of acebutolol and its active metabolite diacetolol in spiked human plasma, H. Jiang, C. Randlett, H. Junga, X. Jiang, Q. C. Ji, *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 173-180.

- [124] Rapid and simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography – tandem mass spectrometry: Application to a clinical herb-drug interaction study, X. Wang, J. Li, Y. Lu, X. Chen, M. Huang, B. Chowbay, S. Zhou, *J. Chromatogr. B*, 852 (2007) 534-544.
- [125] Liquid-chromatographic analysis for esmolol and its major metabolite in urine, R. Achari, D. Drissel, J. D. Hulse, *Clin. Chem.*, 32 (1986) 374-376.
- [126] Enantioselective determination of oxprenolol and its metabolites in human urine by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis, F. Li, S. F. Cooper, S. R. Mikkelsen, *J. Chromatogr. B*, 674 (1995) 277-285.
- [127] Comparative ecotoxicological hazard assessment of beta-blockers and their human metabolites using a mode-of-action-based test battery and a QSAR approach, B. I. Escher, N. Bramaz, M. Richter, J. Lienert, *Environ. Sci. Technol.*, 40 (2006) 7402-7408.
- [128] Sotalol: A new β -adrenergic blocker for ventricular arrhythmias, E. Cavusodlu, W. H. Frishman, *Progr. Card. Dis.*, 37 (1995) 423-440.
- [129] Biotransformation of nimodipine in rat, dog, and monkey, D. Scherling, K. Bühner, H. P. Krause, W. Karl, C. Wünsche, *Arzneimittelforschung*, 41 (1991) 392-398.
- [130] High-performance liquid chromatographic determination of famotidine in urine, A. Rahman, N. E. Hoffman, *J. Chromatogr.*, 428 (1988) 395-401.
- [131] Analytical method for the quantification of famotidine, an H₂-receptor blocker, in plasma and urine, W. C. Vincek, M. L. Constanzer, G. A. Hessey, W. F. Bayne, *J. Chromatogr.*, 338 (1985) 438-443.
- [132] Determination of nizatidine and two of its main metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography, A. Tracqui, P. Kintz, P. Mangin, *J. Chromatogr.*, 529 (1990) 369-376.
- [133] Atenolol: pharmacokinetic/dynamic aspects of comparative developmental toxicity, S. A. Tabacova, C. A. Kimmel, *Reprod. Toxicol.*, 16 (2002) 1-7.
- [134] Multiple inverse isotope dilution assay for oxprenolol and nine metabolites in biological fluids, W. Dieterle, J. W. Faigle, *J. Chromatogr.*, 259 (1983) 301-310.
- [135] Colonic metabolism of ranitidine: implications for its delivery and absorption, A. W. Basit, L. F. Lacey, *Int. J. Pharmaceutics*, 227 (2001) 157-165.

- [136] Quantification and rapid metabolite identification in drug discovery using API time-of-flight LC/MS, N. Zhang, S. T. Fountain, H. Bi, D. T. Rossi, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 800-806.
- [137] Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry, S. C. Brown, G. Kruppa, J-L. Dasseux, *Mass Spectrom. Rev.*, 24 (2005) 223-231.
- [138] A software filter to remove interference ions from drug metabolites in accurate mass liquid chromatography/mass spectrometric analyses, H. Zhang, D. Zhang, K. Ray, *J. Mass Spectrom.*, 38 (2003) 1110-1112.
- [139] Exact mass measurement of polar organic molecules at low resolution using electrospray ionization and a quadrupole mass spectrometer, A. N. Tyler, E. Clayton, B. N. Green, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3561-3569.
- [140] Accurate mass measurements of some glucuronide derivatives by electrospray low resolution quadrupole mass spectrometry, R. Kostianen, J. Tuominen, L. Luukkanen, J. Taskinen, B. N. Green, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11 (1997) 283-285.
- [141] Systematic LC/MS metabolite identification in drug discovery, N. J. Clarke, D. Rindgen, W. A. Korfmacher, K. A. Cox, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 431A-439A.
- [142] Studies on the metabolism of omeprazole in the rat using liquid chromatography/ion spray mass spectrometry and the isotope cluster technique with [³⁴S]omeprazole, L. Weidolf, T. R. Covey, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 6 (1992) 192-196.
- [143] Recent advances in the applications of radio isotopes in drug metabolism, toxicology and pharmacokinetics, D. Dalvie, *Curr. Pharm. Des.*, 6 (2000) 1009-1028.
- [144] Structural elucidation of drug metabolites by triple-quadrupole mass spectrometry, R. J. Perchalski, R. A. Yost, B. J. Wilder, *Anal. Chem.*, 54 (1982) 1466-1471.
- [145] Advances in the application of mass spectrometry to studies of drug metabolism, pharmacokinetics and toxicology, T. A. Baillie, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 118/119 (1992) 289-314.
- [146] Rapid liquid chromatography with tandem mass spectrometry-based screening procedures for studies on the biotransformation of drug candidates, C. L. Fernández-Metzler, K. G. Owens, T. A. Baillie, R. C. King, *Drug Metab. Dispos.*, 27 (1998) 32-40.

- [147] Use of electrospray ionization and neutral loss liquid chromatography/tandem mass spectrometry in drug metabolism studies, P. J. Jackson, R. D. Brownsill, A. R. Taylor, B. Walther, J. Mass Spectrom., 30 (1995) 446-451.
- [148] Utility of the parent-neutral loss scan screening technique: partial characterization of urinary metabolites of U-78875 in monkey urine, J. J. Vrbanc, I. A. O'Leary, L. Baczynskij, Biol. Mass Spectrom., 21 (1992) 517-522.
- [149] Analytical strategies for identifying drug metabolites, C. Prakash, C. L. Shaffer, A. Nedderman, Mass Spectrom. Rev., 26 (2007) 340-369.
- [150] Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry, X. Miao, C. D. Metcalfe, J. Chromatogr. A, 998 (2003) 133-141.
- [151] HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin, L. Nováková, D. Šatínský, P. Solich, Trends Anal. Chem., 27 (2008) 352-367.
- [152] Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry detection, N. M. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, 1134 (2006) 101-111.
- [153] Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Anal. Chem., 75 (2003) 3019-3030.
- [154] Standard line slopes as a measure of relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis, B.K. Matuszewski, J. Chromatogr. B, 830 (2006) 293-300.